

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



## TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones inyectables de meloxicam  
y amoxicilina sódica para uso veterinario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Thuy Dao Thanh

Directoras

Paloma Marina de la Torre Iglesias  
Covadonga Álvarez Álvarez

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



# Desarrollo Galénico de Nuevas Formulaciones Inyectables de Meloxicam y Amoxicilina Sódica para Uso Veterinario

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

**Thuy Dao Thanh**

Directores:

Paloma Marina de la Torre Iglesias

Covadonga Álvarez Álvarez

Madrid, Septiembre, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



# Desarrollo Galénico de Nuevas Formulaciones Inyectables de Meloxicam y Amoxicilina Sódica para Uso Veterinario

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

**Thuy Dao Thanh**

Directores:

Paloma Marina de la Torre Iglesias

Covadonga Álvarez Álvarez

Madrid, Septiembre, 2012



# Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento:

Al Dr. Juan José Torrado Durán, como Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por haberme permitido realizar esta Tesis en el Departamento a su cargo.

A la Dras. Paloma y Covadonga, como Directoras de esta Tesis Doctoral, por haber acogido bajo su tutela, por su constante apoyo y dedicación durante estos años en todo momento.

Al Dr. Juan José García, por su gran ayuda en el estudio farmacocinético de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Santiago Torrado Durán y al Dra. María Camacho, por sus consejos.

A todos mis amigos de departamentos: Helga, Lily, Juliana, Fátima, Loly por acompañarme durante estos años del trabajo. Y a mis amigos españoles: Susana, Yoly, Guzmán, Charly, Leo, Ita, Agapit, Raquel por apoyarme.

A mis padres, mi marido Khanh y mi hijito Bao Son por sus amores incondicionales.

Finalmente, deseo expresar mis profundos agradecimientos a la organización AE-CID de ministerio de asunto exterior MAE por su apoyo financiero sin el cual no pudiera realizar esta Tesis Doctoral.



## Resumen

Se ha estudiado la influencia de varios excipientes, de los más apropiados para la administración parenteral: surfactantes (Tween<sup>®</sup>80, Span<sup>®</sup>85, lecitina de soja), hidratos de carbono (manitol, glucosa, sorbitol), sacarina sódica, un polímero aniónico (carboximetilcelulosa) e hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina en la solubilidad de meloxicam en medios acuosos y en el tampón glicina-NaOH de pHs 7,4, 8,8 y 9,8. A partir de los resultados de las pruebas de solubilidad de MLX, se han elaborado las formulaciones liofilizadas más adecuadas de meloxicam y amoxicilina. Dichas formulaciones se realizaron mediante la disolución de ambos principios activos en un tampón glicina-NaOH de pH 8,8 en presencia de sacarina sódica o hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. A continuación se realizó la caracterización física-química de las dos formulaciones mediante distintas técnicas analíticas IR, XRD, SEM y el estudio de inocuidad *in vitro* mediante pruebas de hemólisis y de precipitación. Asimismo se realizó un estudio farmacocinético comparativo entre las formulaciones y sus disoluciones control tras su administración intramuscular en ratones. Finalmente, se hizo un estudio comparativo de la estabilidad de las formulaciones seleccionadas en dos condiciones: de almacenamiento y aceleradas, también se realizó la estabilidad en condiciones de utilización de las disoluciones obtenidas después de 24 horas tras la reconstitución de los liofilizados.





# Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	III
Índice general	V
Índice de figuras	XI
Índice de tablas	XV
Introducción	1
Objetivo y Planteamiento	5
1. Formas farmacéuticas parenterales en la medicina veterinaria	7
1.1. Formas líquidas . . . . .	10
1.2. Sistemas oleosos (soluciones oleosas, suspensiones y emulsiones de fase externa oleosa) . . . . .	11
1.3. Formulaciones que se convierten en sólidas en el lugar de administración	11
1.4. Formulaciones sólidas . . . . .	11
1.5. Polvos para inyección . . . . .	12
Bibliografía . . . . .	12
2. Meloxicam y Amoxicilina Sódica	15
2.1. Meloxicam . . . . .	17
2.1.1. Descripción . . . . .	17
2.1.2. Estructura química y características físico químicas . . . . .	18
2.1.3. Propiedades farmacológicas . . . . .	18
2.1.4. Indicaciones . . . . .	19

2.2. Amoxicilina . . . . .	20
2.2.1. Descripción . . . . .	20
2.2.2. Características físico químicas de AMX sódica . . . . .	20
2.2.3. Propiedades farmacológicas . . . . .	22
2.2.4. Indicaciones . . . . .	24
Bibliografía . . . . .	24
<b>3. Solubilizantes Utilizados en el Desarrollo Farmacéuticos</b>	<b>29</b>
3.1. Surfactantes no iónicos . . . . .	30
3.2. Azúcares . . . . .	31
3.3. Polímeros hidrofílicos: carboxilmetil celulosa . . . . .	31
3.4. Sacarina sódica . . . . .	32
3.5. Ciclodextrinas . . . . .	32
Bibliografía . . . . .	34
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>37</b>
4.1. Materiales . . . . .	37
4.1.1. Materias primas . . . . .	37
4.1.2. Reactivos empleados . . . . .	38
4.1.3. Disoluciones utilizadas . . . . .	38
4.2. Instrumental . . . . .	39
4.3. Métodos analíticos . . . . .	39
4.3.1. Método empleado en la determinación de coeficiente de solubilidad de MLX . . . . .	40
4.3.2. Métodos empleados en la preparación de las formulaciones . . . . .	41
4.3.3. Métodos empleados en la caracterización de las formulaciones: reconstitución, rendimiento y determinación de pH . . . . .	43
4.3.4. Técnicas analíticas para la cuantificación de MLX en los estudios de preformulación y determinación de rendimiento de las formulaciones: espectrofotometría U.V . . . . .	43
4.3.5. Métodos empleados en la caracterización químico-física de las materias primas y formulaciones . . . . .	44
4.3.6. Métodos empleados en los ensayos de determinación de inocuidad <i>in vitro</i> de las formulaciones . . . . .	45

4.3.7. Diseño de estudio de estabilidad de las formulaciones y las técnicas analíticas para la cuantificación de MLX y AMX durante el estudio . . . . .	46
4.3.8. Diseño de estudio farmacocinético de las formulaciones y las técnicas analíticas para la cuantificación de MLX y AMX durante el estudio . . . . .	48
Bibliografía . . . . .	50
<b>5. Validación de Métodos Analíticos</b>	<b>53</b>
5.1. Análisis de MLX por espectrofotometría directa U.V . . . . .	55
5.1.1. Selectividad . . . . .	55
5.1.2. Linealidad . . . . .	57
5.1.3. Precisión . . . . .	58
5.1.4. Recuperación . . . . .	60
5.1.5. Sensibilidad . . . . .	61
5.2. Análisis de MLX por espectrofotometría de primera derivada . . . . .	61
5.2.1. Selectividad . . . . .	62
5.2.2. Linealidad . . . . .	63
5.2.3. Precisión . . . . .	64
5.2.4. Recuperación . . . . .	66
5.2.5. Sensibilidad . . . . .	67
5.3. Análisis de AMX por Espectrofotometría de primera derivada . . . . .	67
5.3.1. Selectividad . . . . .	69
5.3.2. Linealidad . . . . .	69
5.3.3. Precisión . . . . .	71
5.3.4. Recuperación . . . . .	72
5.3.5. Sensibilidad . . . . .	73
5.4. Análisis simultáneo de AMX y MLX por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) . . . . .	73
5.4.1. Selectividad . . . . .	74
5.4.2. Linealidad . . . . .	77
5.4.3. Precisión . . . . .	80
5.4.4. Exactitud . . . . .	83
5.4.5. Sensibilidad . . . . .	85

5.5. Método analítico para determinación de AMX y MLX en los estudios farmacocinéticos . . . . .	86
5.5.1. Selectividad . . . . .	87
5.5.2. Linealidad . . . . .	88
5.5.3. Precisión . . . . .	89
5.5.4. Exactitud . . . . .	90
5.5.5. Sensibilidad . . . . .	91
Bibliografía . . . . .	91
<b>6. Selección de excipientes mediante el estudio de coeficiente de solubilidad</b>	<b>93</b>
6.1. Efecto de distintos excipientes sobre la solubilidad de MLX . . . . .	93
6.2. Efecto de los excipientes sobre la solubilidad de MLX en el tampón pH 11,2 . . . . .	100
6.3. Efecto de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina sobre la solubilidad de MLX	101
6.4. Efecto de diferentes tampones pH 8,8 sobre la solubilidad de MLX . .	103
6.5. Obtención de formulaciones a partir de los estudios de solubilidad . .	103
6.6. Discusión parcial . . . . .	105
Bibliografía . . . . .	106
<b>7. Caracterización físico-química de las formaciones seleccionadas por las técnicas instrumentales</b>	<b>109</b>
7.1. Caracterización de liofilizados por IR . . . . .	110
7.2. Caracterización de liofilizados por XRD . . . . .	112
7.3. Caracterización de liofilizados por SEM . . . . .	116
7.4. Discusión parcial . . . . .	120
Bibliografía . . . . .	120
<b>8. Estudio de inocuidad <i>in vitro</i> de las formulaciones seleccionadas</b>	<b>123</b>
8.1. Estudio hemolítico <i>in vitro</i> de las formulaciones seleccionadas . . . .	124
8.2. Estudio de precipitación <i>in vitro</i> de las formulaciones seleccionadas .	125
8.3. Discusión parcial . . . . .	126
Bibliografía . . . . .	126

<b>9. Estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas</b>	<b>129</b>
9.1. Resultados del estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas y de la disolución control tras su administración i.m . . . . .	130
9.2. Estudio de distintos parámetros farmacocinéticos y su análisis estadístico . . . . .	134
9.3. Discusión parcial . . . . .	138
Bibliografía . . . . .	139
<b>10. Estudio de estabilidad de las formulaciones seleccionadas</b>	<b>141</b>
10.1. Estudio comparativo de estabilidad de las formulaciones seleccionadas	141
10.2. Estudio de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones seleccionadas . . . . .	147
10.3. Caracterización de formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> por DSC . . . .	148
10.4. Conclusión parcial . . . . .	154
Bibliografía . . . . .	154
<b>Discusión final</b>	<b>157</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>163</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>165</b>



## Índice de figuras

2.1. Estructura química de MLX . . . . .	18
2.2. Mecanismo nucleofílico de degradación de la amoxicilina sódica: (I) amoxicilina sódica; (II) amoxiciloilester; (III) ácido amoxiciloico; (IV) piperazinediona [35]. . . . .	21
3.1. Estructura química de sacarina sódica . . . . .	32
3.3. Equilibrio de unión de fármaco con una ciclodextrina para formar un complejo de inclusión 1:1 [17]. . . . .	33
3.2. Estructuras químicas y las dimensiones de la cavidad de las $\alpha$ , $\beta$ , y $\gamma$ ciclodextrinas [16]. . . . .	34
5.1. Espectro normal de MLX 3,75 $\mu\text{g/ml}$ (—), Tween <sup>®</sup> 80 a la dilución 1:50 realizada con tampón PBS (—), Span <sup>®</sup> 85 a la dilución 1:50 realizada con tampón PBS (—) y lecitina de soja a la dilución 1:50 realizada con tampón PBS (—). . . . .	56
5.2. Espectros normales de mezcla de MLX 1 $\mu\text{g/ml}$ y AMX 20 $\mu\text{g/ml}$ (—) y de placebo de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> (---) . . . . .	56
5.3. Recta de calibrado de MLX en tampón PBS. . . . .	58
5.4. Barridos de primera derivada de meloxicam (—), de lecitina de soja (—) y barrido de espectro normal de lecitina de soja (—) . . . . .	63
5.5. Recta de calibrado de MLX en el espectro de primera derivada a 335 nm . . . . .	64
5.6. Espectro normal de MLX 1 $\mu\text{g/ml}$ (—), de AMX 20 $\mu\text{g/ml}$ (—), de mezcla de MLX 2 $\mu\text{g/ml}$ y AMX 40 $\mu\text{g/ml}$ (—) a las cuales concentraciones proporcionales a las concentraciones de las formulaciones. . . . .	68
5.7. Espectro de primera derivada de MLX 1 $\mu\text{g/ml}$ (—), de AMX 20 $\mu\text{g/ml}$ (—), de mezcla de MLX 2 $\mu\text{g/ml}$ y AMX 40 $\mu\text{g/ml}$ (—). . . . .	68



5.8. Espectros de primera derivada de la mezcla de MLX 1 µg/ml y AMX 20 µg/ml (—) a las concentraciones proporcionales a las de las formulaciones y del placebo de la formulación AMX:MLX:sacarina (---).	69
5.9. Recta de calibración de AMX en tampón PBS.	70
5.10. Cromatogramas de: <b>A)</b> la mezcla de MLX a concentración de 15 µg/ml y AMX a concentración de 50 µg/ml, <b>B)</b> blanco de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> , <b>C)</b> blanco de formulación <i>MLX:AMX:CD</i> respectivamente.	75
5.11. Cromatogramas de la mezcla de MLX y AMX a concentración inicial de 2 µg/ml y 40 µg/ml, respectivamente y sus productos de degradación: <b>A)</b> degradación con calor, <b>B)</b> en medio ácido, <b>C)</b> en medio básico, <b>D)</b> en agua oxidada.	76
5.12. Cromatogramas: <b>A)</b> de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> , <b>B)</b> de la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> , recientemente preparadas.	77
5.13. Recta de calibrado de AMX por HPLC.	78
5.14. Recta de calibrado de AMX por HPLC.	79
5.15. Cromatogramas de <b>A)</b> blanco de plasma, <b>B)</b> patrón de AMX y MLX correspondientes a concentración de 10 µg/ml, <b>C)</b> plasma cargada de AMX y MLX a concentración de 1 µg/ml, respectivamente	86
5.16. Cromatogramas de <b>A)</b> patrón de AMX a concentración de 20 µg/ml, <b>B)</b> de plasma, <b>C)</b> de plasma cargada de AMX y MLX a concentración de 1 µg/ml.	87
5.17. Recta de calibrado de AMX por HPLC.	88
6.1. Diagramas de fase de solubilidad de MLX: HP-β-CD en agua (♦), pH 7,4 (■), pH 8,8 (▲), pH 9,8 (●)	102
7.1. Espectro IR de MLX materia prima (a), glicina (b), HP-β-CD (c), mezcla física correspondiente (d), formulación MLX:CD (e).	111
7.2. Espectro IR de MLX materia prima (a), glicina (b), sacarina sódica (c), mezcla física correspondiente (d), formulación MLX:Sacarina (e).	112
7.3. Difractogramas: <b>A:</b> Difractogramas de glicina (a), sacarina sódica (b), HP-β-CD (c), MLX materia prima (d), AMX materia prima (e). <b>B:</b> Ampliación de difractogramas de b, c, d, e.	114

7.4. Difractogramas de MLX (a), AMX (b), HP- $\beta$ -CD (c), la mezcla física de MLX, AMX,HP- $\beta$ -CD, glicina a la misma proporción de la formulación (d), formulación <i>MLX:AMX:CD</i> (e) . . . . .	115
7.5. Difractogramas de MLX (a), AMX (b), Sacarina sódica (c), mezcla física correspondiente (d), y formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> (e) . . .	116
7.6. Microfotografía de los cristales de MLX, X 1500 aumentos . . . . .	117
7.7. Microfotografía de los cristales de AMX, X 1500 aumentos . . . . .	117
7.8. Microfotografía de la mezcla física de formulación <i>MLX:AMX:CD</i> , x 1500 aumento . . . . .	118
7.9. Microfotografía de la mezcla física de formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> , x 1500 aumento . . . . .	118
7.10. Microfotografía de estructura de liofilizado de formulaciones <i>MLX:AMX:CD</i> , x 1500 aumento. . . . .	119
7.11. Microfotografía de estructura de liofilizado de formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> , x 1500 aumento. . . . .	119
8.1. Resultado del estudio hemolítico <i>in vitro</i> . . . . .	125
9.1. Representaciones gráficas de los valores medios y desviaciones estándar de las concentraciones plasmáticas de MLX en las formulaciones <i>MLX:AMX:CD</i> , <i>MLX:AMX:Sacarina</i> y de la disolución control tras la administración i.m. de una dosis única de 0,5 mg/kg de principio activo . . . . .	132
9.2. epresentaciones gráficas de los valores medios y desviaciones estandar de las concentraciones plasmáticos de AMX en las dos formulaciones <i>MLX:AMX:CD</i> y <i>MLX:AXM:Sacarina</i> y de la disolución control tras la administración i.m. a una dosis única de 10 mg/kg . . . . .	134
10.1. Espectro calorímetro de MLX. . . . .	149
10.2. Espectro calorímetro de AMX. . . . .	150
10.3. Espectro calorimétrico de glicina. . . . .	151
10.4. Espectro calorimétrico de sacarina sódica. . . . .	151
10.5. Espectro calorimétrico de la mezcla de MLX:AMX a la relación 1:20. . . . .	152
10.6. Espectro calorimétrico de la mezcla física de MLX, AMX, glicina y sacarina sódica correspondiente a la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> . . . . .	153
10.7. Espectro calorimétrico del placebo de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> . . . . .	153

10.8. Espectro calorimétrico de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> . . . . .	154
11.1. El porcentaje de contenido de fármacos de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> y sus desviaciones estándar al frente del tiempo . . . . .	161
11.2. El porcentaje de contenido de fármacos de la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> y sus desviaciones estándar al frente del tiempo . . . . .	162

## Índice de tablas

4.1. Formulaciones seleccionadas en la primera etapa preparada solo con MLX y formulaciones finales con ambos principios activos (MLX y AMX). . . . .	42
4.2. Condiciones del estudio de estabilidad . . . . .	47
5.1. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ .	57
5.2. Precisión del método mediante estudios de repetibilidad para muestras a las que se les adiciona un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX. . . . .	59
5.3. Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX . . . . .	60
5.4. Resultados de recuperación de MLX en las muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), 100 % (3 µg/ml); 125 % (3,75 µg/ml) de MLX. .	61
5.5. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ .	63
5.6. Precisión del método mediante estudios de repetibilidad para muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX. . . . .	65
5.7. Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX. . . . .	66
5.8. Resultados del estudio de recuperación de MLX en presencia de una muestra placebo de lecitina de soja en tampón PBS a 2,3 % para muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), 100 % (3 µg/ml); 125 % (3,75 µg/ml) de MLX. . . . .	67
5.9. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ .	70

5.10. Precisión del método mediante estudios de repetibilidad para muestras que contienen un 75 % (30 µg/ml), un 100 % (40 µg/ml) y un 125 % (50 µg/ml) de MLX. . . . .	71
5.11. Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX . . . . .	72
5.12. Resultados de recuperación de MLX en las muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), 100 % (3 µg/ml); 125 % (3,75 µg/ml) de MLX. . . . .	73
5.13. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ . . . . .	78
5.14. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ . . . . .	79
5.15. Precisión del método mediante el estudio de repetibilidad para AMX a los tres niveles de concentración. . . . .	80
5.16. Precisión del método mediante el estudio de repetibilidad para MLX a los tres niveles de concentración. . . . .	81
5.17. Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX . . . . .	82
5.18. Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX . . . . .	82
5.19. Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX. . . . .	83
5.20. Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX. . . . .	84
5.21. Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX. . . . .	84
5.22. Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX. . . . .	85
5.23. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ . . . . .	88
5.24. Precisión del método mediante el estudio de repetibilidad para AMX a los tres niveles de concentración. . . . .	89

5.25. Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX . . . . .	90
5.26. Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX. .	91
6.1. Potencial de solubilización (k) de MLX para varios tampones con diferentes excipientes. . . . .	94
6.2. Solubilidad de MLX con diferentes excipientes y tampón pH 7,4 . . .	98
6.3. Solubilidad de MLX con diferentes excipientes y tampón pH 8,8 . . .	98
6.4. Solubilidad de MLX con diferentes excipientes y tampón pH 9,8 . . .	99
6.5. Solubilidad de MLX con diversos excipientes y tampón pH 11,2 en proporción 80:20 (v/v). . . . .	100
6.6. Solubilidad de MLX en agua, y en tampones de pH 7,4: 8,8 y 9,8, a diferentes concentraciones de HP-β-CD. . . . .	102
6.7. Solubilidad de MLX en tampón pH 8,8 de glicina 0,023 M; 0,027 M; 0,033 M y tampón de glicina 0,033 M con los excipientes elegidos . .	103
6.8. Prueba de reconstitución, aspecto de la solución reconstituida, riqueza y pH de las formulaciones preparadas en la primera etapa del estudio de preformulación . . . . .	104
6.9. Prueba de reconstitución, aspecto de la disolución reconstituida, riqueza y pH de las formulaciones preparadas en la segunda etapa del estudio de preformulación . . . . .	105
8.1. Presencia (+) o ausencia (-) de precipitación en las formulaciones <i>MLX:AMX:CD</i> y <i>MLX:AMX:Sacarina</i> . . . . .	126
9.1. Resultados del estudio farmacocinético de MLX en la disolución control tras su administración a una dosis de 0,5 mg/kg por vía i.m. . . .	130
9.2. Resultados del estudio farmacocinético de MLX en la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> tras su administración a una dosis de 0,5 mg/kg i.m.	131
9.3. Resultados del estudio farmacocinético de MLX en la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> tras su administración a una dosis de 0,5 mg/kg i.m. . . . .	131

9.4. Resultados del estudio farmacocinético de AMX en la disolución control tras su administración a una dosis de 10 mg/kg i.m. . . . .	132
9.5. Resultados del estudio farmacocinético de AMX en la formulación <i>MLX:AMX:CD</i> tras su administración a una dosis de 10 mg/kg i.m. .	133
9.6. Resultados del estudio farmacocinético de AMX de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> tras su administración a una dosis de 10 mg/kg i.m. . . . .	133
9.7. Parámetros farmacocinéticos de MLX y AMX en diferentes formulaciones tras la administración i.m. de una única dosis de ambos fármacos (0,05 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente). . . . .	136
9.8. Los valores de probabilidad (P) del análisis ANOVA con un nivel de confianza de 95 % entre la disolución control y cada una de las formulaciones estudiadas y entre las dos formulaciones con los valores de $C_{max}$ y $AUC_0^\infty$ . . . . .	137
10.1. Resultado de estudio de estabilidad de formulación <i>MLX:AMX:CD</i> a temperatura 25 °C . . . . .	144
10.2. Resultado de estudio de estabilidad de formulación <i>MLX:AMX:CD</i> a temperatura 40 °C . . . . .	144
10.3. Resultado de estudio de estabilidad de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> a 25 °C. . . . .	146
10.4. Resultado de estudio de estabilidad de la formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i> a 40 °C. . . . .	146
10.5. Resultado de estudio de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones <i>MLX:AMX:CD</i> y <i>MLX:AMX:Sacarina</i> . . . . .	148

# Introducción

Los animales ofrecen multitud de beneficios al ser humano. Si bien los de compañía, deporte o trabajo satisfacen necesidades importantes en la sociedad actual, no debemos dejar de considerar que la obtención de alimentos de origen animal ha sido históricamente, y sigue siendo, uno de los pilares fundamentales en los que se ha basado la alimentación humana. Asimismo, cabe destacar la importancia económica de la actividad ganadera en nuestra sociedad.

Por todo ello, desde los tiempos en que comenzó la domesticación de los animales y su crianza el hombre improvisó remedios para tratar de paliar el sufrimiento y la pérdida de animales que ocasionaban las enfermedades, las lesiones o los accidentes. Fruto de la experiencia y gracias al enorme progreso de las ciencias veterinarias sobre el conocimiento, diagnóstico y tratamiento de las dolencias, nos encontramos en un momento en el que, afortunadamente, se dispone de los medios necesarios para que los animales de compañía, de producción, ocio y deporte e incluso los animales silvestres, tengan a su disposición profesionales y herramientas que puedan garantizar su adecuado estado de salud y bienestar.

No cabe duda de que la sanidad animal constituye un elemento crítico que tiene una gran repercusión en el estado sanitario y de bienestar de los animales. Hoy día como complemento a la pericia del profesional veterinario, existe en el mercado una amplia gama de productos que contribuyen a mantener un buen estado de salud de los animales, primero con el diagnóstico precoz de las enfermedades, pasando por la prevención de las mismas y si ésta no ha sido posible, con el tratamiento adecuado. En este contexto, merece ser destacada la contribución del desarrollo de medicamentos como los antibióticos o las vacunas o de herramientas de diagnóstico que han permitido prevenir, controlar y erradicar, en la medida de lo posible, enfermedades persistentes y muy costosas para los ganaderos y que suponían un riesgo para la salud pública.



Además, el tratamiento y la prevención de las enfermedades conllevan una mejora en el estado de salud de los animales, evitando el sufrimiento derivado de las mismas lo que influye positivamente en su bienestar. Un estado óptimo de salud es la condición previa al complejo conjunto que integra el concepto de bienestar.

Por otro lado, la sanidad animal resulta fundamental para garantizar la salud pública y la seguridad y abastecimiento de alimentos. Los animales sanos son imprescindibles para la obtención de unos alimentos seguros, de calidad y a precios razonables que satisfagan las necesidades de la población. Algunas enfermedades animales también plantean amenazas graves para la salud pública al ser transmisibles al hombre desde los animales (zoonosis), bien directamente o a través de los alimentos como puedan ser tuberculosis, brucelosis, salmonelosis, listeriosis, etc. En este sentido, los programas sanitarios coordinados entre las diferentes administraciones y los profesionales veterinarios, así como la disponibilidad de herramientas, suponen un elemento clave a la hora de garantizar un elevado nivel de salud pública y de seguridad alimentaria reduciendo al mínimo la incidencia de enfermedades con repercusión en la salud de los consumidores. Por otro lado, cabe destacar la importancia estratégica de la sanidad animal en el marco de la sostenibilidad y competitividad de la producción ganadera. De hecho, constituye una de las barreras al comercio de animales vivos y productos de origen animal. Asimismo, la obtención de animales sanos resulta fundamental para proporcionar unos alimentos de origen animal seguros y de calidad a la industria agro-alimentaria, contribuyendo asimismo a su competitividad y liderazgo en el entorno nacional e internacional. En los últimos años se han producido graves crisis de sanidad animal que han tenido consecuencias devastadoras en términos económicos tanto a nivel global como europeo y nacional. La gripe aviar, la fiebre aftosa, la enfermedad espongiforme bovina (EEB) o la lengua azul son claros ejemplos de enfermedades que han provocado crisis que han afectado de forma directa a la renta de los productores y han afectado negativamente a la economía general de los países afectados como consecuencia de los problemas de comercialización y de mercados. Igualmente, ante una crisis sanitaria, aumenta la desconfianza de los consumidores, lo que conlleva un descenso del consumo.

Además de todo esto, la sanidad animal ayuda a preservar el medio ambiente. Según datos de la OIE, las enfermedades serían responsables del 20 % de las pérdidas de la producción animal. Por tanto, de no controlarse, ello conllevaría que para producir la misma cantidad de alimentos, se necesitarían muchos más animales. Ello implicaría una mayor utilización de recursos naturales (terreno para producir

materias primas, agua, etc.) y una mayor cantidad de residuos orgánicos que gestionar.

Debido a esta importancia estratégica que tiene la sanidad animal por su repercusión en la salud y bienestar animal, salud pública y seguridad alimentaria, el medio ambiente y la economía rural, se ha puesto de manifiesto la necesidad de potenciar una investigación, desarrollo tecnológico e innovación que permita dar respuesta a las necesidades y restos sanitarios a los que se enfrentan las distintas especies y modelos de producción existentes.

En este contexto, se impulsó la creación de la Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal (Vet+i) en Julio de 2008, con el objetivo de promover, a través del trabajo conjunto de la comunidad científica, los sectores ganaderos, la profesión veterinaria, la industria de sanidad animal y la Administración pública, el desarrollo de nuevos productos y tecnologías innovadoras que contribuyan a paliar las necesidades de la profesión veterinaria y los propietarios de animales de compañía y de producción, lo que redundará en el beneficio de la sociedad en general.

Dada la importancia que tiene el llegar a obtener productos veterinarios de calidad hemos decidido trabajar en este campo.



# Objetivo y Planteamiento

## Objetivo

El objetivo de esta tesis es la elaboración de nuevas formulaciones parenterales liofilizadas de meloxicam (MLX) y amoxicilina sódica (AMX) de liberación inmediata para su uso veterinario.

## Planteamiento

El planteamiento para la realización de este trabajo es el siguiente:

1. Selección de los excipientes y tampones con un rango de pHs entre 7,4-11,2 que aumenten la solubilidad acuosa de MLX.
2. Desarrollo las formulaciones de MLX y AMX mediante la técnica de liofilización.
3. Caracterización físico-química y estudio de inocuidad *in vitro* de las formulaciones desarrolladas.
4. Realización de estudios comparativos de la farmacocinética de las formulaciones mediante su administración intramuscular en ratones como animales de experimentación.
5. Estudio de estabilidad en varias condiciones y de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones seleccionadas.



## Capítulo 1

# Formas farmacéuticas parenterales en la medicina veterinaria

Teniendo en cuenta los estudios realizados por Wood Mackenzie Global Consultants [1] el mercado mundial de sanidad veterinaria movió cerca de 11 mil millones en ventas en el año 2010. Dentro de las distintas especialidades tanto los anti-infecciosos como los anti-parasitarios ocupan aproximadamente el 50 % de la cuota de mercado. Los productos farmacéuticos destinados al ganado dominan el mercado de salud veterinaria y cuentan con un 70 % de las ventas.

Existen muchas similitudes entre las industrias farmacéuticas para uso veterinario y para uso humano. Sin embargo encontramos también notables diferencias que merecen la pena destacar. En el desarrollo de medicamentos para uso veterinario, la evaluación de seguridad y eficacia es más rápida que en los de uso humano debido a que se puede prescindir de estudios de preclínica y fase I clínica. A pesar de esta ventaja el desarrollo de formulaciones para uso veterinario es complejo y diverso debido a diferentes factores que a continuación se mencionan: sensibilidad de coste, sensibilidad al clima, múltiples especies y razas, amplias variabilidades en el peso animal, conveniencias y satisfacción de consumidores.

Entre los productos veterinarios comercializados, las formulaciones parenterales tienen una importancia relevante en la sanidad veterinaria. Aproximadamente el 33 % del total de las formulaciones de uso veterinario corresponden a administración parenteral [2, 3]. Las principales causas que justifican el tratamiento son: mejorar infecciones respiratorias, conseguir una correcta alimentación, engorde, crecimiento y mejora en la calidad de la leche de consumo. Para determinadas indicaciones el desarrollo de nuevas formulaciones que incluyan dos o más principios activos para administración única está cobrando cada vez mayor importancia y relevancia, debi-

---

do a la efectividad que dota al proceso. También se debe destacar la comodidad que supone tanto para el propietario como para el animal las limitadas administraciones que deberán ser practicadas. Desde el punto de vista de la industria farmacéutica debemos señalar que el desarrollo de nuevas formulaciones para determinadas patologías convenientemente justificadas incrementa su mercado así como facilita la protección de sus patentes.

Las formulaciones parenterales son habitualmente administradas vía parenteral de forma intramuscular o bien subcutánea [4]. La elección del sitio de administración va a depender del tipo de animal y del tipo de patología que se vaya a tratar. Por ejemplo, en industria ganadera, la inyección subcutánea será, habitualmente, la primera vía de elección con el fin de minimizar los efectos secundarios producidos en los sitios de inyección, así como la aparición de residuos en el músculo, que en algunos casos conlleva pérdidas en la producción. Hay que tener en cuenta que en animales utilizados para alimentación existe una necesidad imperiosa de administrar cantidades suficientes de medicamentos que conlleven el efecto deseado pero sin embargo que produzcan la menor cantidad posible de residuos, para que los tiempos de espera se reduzcan al máximo. Pero este hecho, aún pareciendo sencillo, limita en muchos casos la buena rentabilidad de algunos tratamientos.

El desarrollo de inyectables para uso veterinario es más complicado que los de uso humano por varias razones. Una de las primarias razones es la tolerancia del sitio de inyección (TSI). TSI es un tema común para ambas áreas de salud tanto humana como veterinaria, sin embargo TSI en uso humano se puede sobrepasar por el cambio de ruta de administración (i. e. por i. v.) o por la administración de una menor cantidad de fármaco en el sitio (inyecciones múltiples) o por el uso de nueva tecnología para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En el caso de ganado, la limitación económica no permite la aplicación de las opciones de dosis y nuevas tecnologías de inyección. La administración parenteral con inyecciones múltiples para animales no es siempre factible debido al coste de trabajo y el manejo. Cuanto más se administran formulaciones cargadas de alta cantidad de fármaco para minimizar las inyecciones múltiples, más alto es el riesgo de precipitación y baja tolerancia en el sitio de inyección. La reacción del tejido local puede tener un efecto perjudicial en la cantidad de fármaco absorbido desde el sitio de inyección [5, 6, 7]. En animales de compañía, problemas de TSI crean dolor e hinchazón. En el ganado, TSI puede causar impactos en la salud humana y la calidad de la carne para consumo. Por lo tanto TSI es un factor importante que debe ser tenido en cuenta para ser valorado

al principio del desarrollo del producto.

Las formulaciones que normalmente se utilizan se clasifican en función de su aspecto físico: formas líquidas, sólidos y soluciones que se convierten en sólido en el lugar en el que se administran actuando como reservorios. Cada formulación y la forma de fabricación propuesta serán de relevante importancia. Los parámetros tanto físico-químicos como farmacocinéticos poseen interés ya que de ellos depende en muchos casos la cesión del medicamento y no debido al tipo de formulación que sea. Las formulaciones tienen que ser tanto química, física, como microbiológicamente estables.

La incorporación de coadyuvantes responde a la necesidad de obtener una forma farmacéutica más segura, estable y eficaz. Por tanto, cualquier coadyuvante que se incorpore tiene una finalidad muy clara y justificada.

Los coadyuvantes deben cumplir una serie de requisitos: deben tener gran pureza física y química, han de estar lo más libres posible de bacterias y otros pirógenos. Para ello se debe partir de materias primas de alta calidad, y poseer atoxicidad. Deben ser perfectamente tolerados por el organismo, no deben interferir con los principios activos, ni en su acción ni en su valoración, y deben ser estables durante el periodo de validez del medicamento.

Algunos excipientes que se usan para la correcta formulación, preparación galénica y mantenimiento del sistema físico-químico se mencionan a continuación:

- Solubilizantes: pretenden aumentar la solubilidad del principio activo. Esto se puede conseguir de varias maneras: buscando derivados más hidrosolubles del fármaco, disminuyendo el tamaño de partícula, formando complejos hidrosolubles, usando dispersiones sólidas o añadiendo cosolventes como, por ejemplo, glicerina.
- Viscosizantes: aumentan la estabilidad de la suspensión o facilitan la preparación de formulas de liberación controlada. Se usan derivados de la celulosa, gelatina hidrolizada, polivinilpirrolidona (PVP) y monoestearato de aluminio.
- Agentes tensioactivos: se usan muy poco por vía parenteral por motivos de toxicidad. Deben ser no iónicos y se deben usar en pequeñísimas cantidades. Los más usados son: fosfolípidos como la lecitina, polisorbatos como el Tween, monooleatos de sorbitán como el Span, éteres de polioxietileno, aceites de ricino polioxietilenados.



- Crioprotectores: mejoran las propiedades físicas de los polvos liofilizados y protegen a los tejidos del crecimiento cristalino cuando se administran estos polvos además de impedir que se produzca un choque osmótico. Se usan azúcares como glucosa y fructosa, aminoácidos y proteínas, electrolitos como el cloruro sódico y disolventes no acuosos como la glicerina.

Las formas farmacéuticas parenterales son:

### 1.1. Formas líquidas

Se consigue una limitada absorción de fármacos hidrosolubles [8] interpuestos en una matriz lipídica. Según estas limitaciones se desarrollan formulaciones líquidas con características de suspensiones, emulsiones de fase externa acuosa u oleosa o bien microemulsiones.

Estas formulaciones representan la tecnología más simple para la producción y fabricación de formulaciones parenterales, sin embargo el estudio en cuanto a su estabilidad puede considerarse el factor limitante, principalmente en las suspensiones como en las emulsiones.

Existen distintas estrategias [8]. Las cuales se encuentran ampliamente estudiadas en cuanto al uso de suspensiones y las estrategias que se deben utilizar con el fin de hacer más efectiva la cesión del principio activo al organismo. Para ello se utilizan los coadyuvantes mencionados anteriormente.

También se ha demostrado que las nanosuspensiones producen menor daño tisular en el lugar de inyección que las suspensiones de carácter oleoso. Además por sus características físicas las nanosuspensiones producen en algunos casos y según la viscosidad que posean mejores niveles en cuanto al retraso en la cesión del producto.

La viscosidad es uno de los factores limitantes que puede jugar un papel importante en lo que respecta a la prolongación en la absorción del principio activo, cuya difusión se vea retardada desde la matriz formada tras la inyección del producto. Algunos viscosizantes importantes pueden ser por ejemplo de la familia del Carboxipol. Aunque la viscosidad debe ser estudiada con detenimiento ya que un exceso en la proporción de viscosizante dificulta e incluso puede llegar a impedir la inyección del producto.

Otro tipo de agentes tensioactivos que aumentan la viscosidad pueden ser por ejemplo los fosfolípidos (lecitina, polisorbatos...). Existen también otros espesantes

como pueden ser Poloxamer 407, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa o hidroxipropilcelulosa.

Otro tipo de formulaciones serán las emulsiones de fase externa acuosa en las cuales pueden ir dispersados fármacos de carácter liposoluble. En caso de uso de la vía parenteral se difundirá la parte acuosa de forma rápida dejando un depósito de gotículas oleosas que actuarán como reservorios y que irán poco a poco cediendo el principio activo al medio. En cada caso la eficacia de la formulación debe ser estudiada teniendo en cuenta la variabilidad de datos de cesión en función del tamaño de las gotículas.

Otros tipos de formulaciones para administración parenteral obteniendo una cesión sostenida pueden ser los liposomas, pero en este caso podemos obtener diferencias significativas en cuanto a la cesión del principio activo al torrente sanguíneo tras la administración subcutánea o bien intramuscular.

## **1.2. Sistemas oleosos (soluciones oleosas, suspensiones y emulsiones de fase externa oleosa)**

Depende fundamentalmente del coeficiente de partición entre el agua y el aceite

## **1.3. Formulaciones que se convierten en sólidas en el lugar de administración**

Algunos fluidos se comportan de una manera conocida como plástica [9] no empiezan a fluir hasta que se haya aplicado un cierto esfuerzo (esfuerzo de cedencia). También existen las sustancias tixotrópicas cuya viscosidad depende de la deformación angular inmediatamente anterior de la sustancia y tiende a solidificarse cuando se encuentra en reposo. En nuestro ámbito, esa forma de solidificar haría convertirse a la formulación líquida en reservorio sólido tras su inyección.

## **1.4. Formulaciones sólidas**

Las formulaciones sólidas [8] en muchos casos, han conseguido una cesión durante semanas, e incluso años. Los implantes sólidos, normalmente son fabricados a partir de polímeros biodegradables, siliconas, bombas osmóticas implantables o sistemas reservorios. Cada uno de los sistemas anteriormente propuestos ofrece ventajas y

desventajas en cuanto a la retirada del producto, costes en investigación, desarrollo y fabricación, resultados en cuanto a la liberación y duración del fármaco en el organismo y compatibilidad entre la matriz y el fármaco.

Si se recurre a un dispositivo de cesión controlada de la sustancia activa, la selección de los materiales formadores de los sistemas en estas formulaciones es vital ya que deben no sólo modular la cesión del fármaco sino ser altamente biocompatibles y exentos de toxicidad, cualidades que deben aplicarse también a los productos de degradación. Estos hechos reducen, considerablemente, el número de materiales empleados. Desde hace treinta años, los polímeros derivados del ácido láctico y glicólico son uno de los biomateriales de mayor aplicación biomédica, fundamentalmente el copolímero derivado de los ácidos láctico y glicólico. Este hecho se basa en la excelente biocompatibilidad de estos polímeros biodegradables junto con la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación. Las cadenas poliméricas son hidrolizadas para formar metabolitos naturales que se eliminan del organismo por el ciclo de Krebs. Dependiendo de su composición y del peso molecular, estos polímeros pueden tener velocidades de degradación que van desde meses hasta años.

## 1.5. Polvos para inyección

Los polvos para inyección constituyen una categoría importante para formas farmacéuticas de fármacos inestables en medio acuoso. Por ello, se comercializan en forma de polvos para ser reconstituidos previamente antes de su administración, con un vehículo adecuado. Los fármacos incluidos en esta categoría son antibióticos betalactámicos, cefalosporinas y aciclovir [10].

## Bibliografía

- [1] W. M. G. Consultants, *Animal Health Industry Review*. Edinburgh, UK: Wood MacKenzie, 2011.
- [2] I. Ahmed, "Pharmaceutical challenges in veterinary product development," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, pp. 871–882, Oct. 2002.
- [3] S. M. Cady, "Status of control release technology in the animal health industry," *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1999.

- [4] D. H. Carter, M. Luttinger, and D. L. Gardner, "Controlled release parenteral systems for veterinary applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 8, pp. 15–22, Nov. 1988.
- [5] P. PYÖRÄLÄ, L. KAARTINEN, and H. SÖDERGÅRD, "Pharmacokinetics and tissue irritation of sodium dicloxacillin in lactating cows after intravenous and intramuscular administration," *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 17, pp. 157–159, Apr. 1994.
- [6] J. F. Nouws, A. Smulders, and M. Rappalini, "A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep.," *The Veterinary quarterly*, vol. 12, pp. 129–38, July 1990.
- [7] F. Rasmussen, "Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs," *Veterinary Science Communications*, vol. 2, pp. 173–182, Dec. 1978.
- [8] N. J. Medlicott, N. A. Waldron, and T. P. Foster, "Sustained release veterinary parenteral products.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 56, pp. 1345–65, June 2004.
- [9] C. Matschke, U. Isele, P. van Hoogevest, and A. Fahr, "Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products.," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 85, pp. 1–15, Dec. 2002.
- [10] J. C. Boylan and S. L. Nail, "Parenteral Products," in *Modern Pharmaceutics* (G. L. Banker and C. T. Rhodes, eds.), p. 445, New York: Marcel Dekker Inc., 1979.



## Capítulo 2

# Meloxicam y Amoxicilina Sódica

La mastitis, enfermedad que se define como la inflamación de las glándulas mamarias, es una de las patologías que más frecuentemente afecta al ganado bovino lechero [1, 2]. Su importancia económica se reconoce mundialmente y sigue siendo la primera causa de uso de antibacterianos en medicina veterinaria. Un tratamiento adecuado se basa, en gran medida, en que el fármaco debe tener un espectro apropiado, alcanzar concentraciones antimicrobianas sin afectar otros sistemas, lograr una gran penetración a sitios infectados, abandonando rápidamente el sitio y sin dejar residuos, además, debe ser activo en presencia de leche y pus. Asimismo, se debe conseguir un mínimo de reducción en capacidad productiva ya que después de sufrir mastitis la producción láctea se ve reducida del 9 % a 45 % [3]. Por todo ello, se ha demostrado que es tan importante el uso de un antibacteriano como el de un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) para el tratamiento de mastitis [4, 5, 6]. Normalmente, no se publican los efectos de los antibióticos sobre la recuperación de la producción láctea, los criterios de curación se limitan a informar sobre la cura clínica o bacteriológica, o ambas. Esto se debe a que a menudo se olvidan de que los antibacterianos solo tienen efecto a este nivel, sin capacidad de disminuir la inflamación o cambiar el pH de un medio o eliminar el pus y los detritus celulares [7]. Los AINEs contribuyen a una elevada eficacia de recuperación en la mastitis clínica y mejora el porcentaje de recuperación de la producción láctea [8]. Éste último es un indicador importante de la efectividad de un tratamiento, porque contempla el grado de rehabilitación de la productividad del tejido glandular y por lo tanto repercute más en la relación de coste/beneficio de un tratamiento. Los AINEs como la flunixin-meglumina, el piroxicam, el ketoprofeno y el meloxicam bloquean la liberación de aminas vasoactivas (serotonina, histamina, cínicas), y seguramente también

---

tiene efecto sobre la lipooxigenasa y ciclooxigenasa, con lo cual evitan la producción de las prostaglandinas y de leucotrienos involucrados en la inflamación [9].

Actualmente a pesar del uso de las vacunas de los virus respiratorios y la aplicación de las medidas preventivas, las infecciones respiratorias agudas siguen afectando a gran medida en los bovinos, equinos y porcinos. En Europa, se calcula que el síndrome respiratorio bovino (BRD) provoca pérdida de hasta 576 millones de euro en la industria bovina [10]. El 58 % de las pérdidas relacionadas a esta enfermedad se deben a la reducción del peso corporal, la mortalidad y los costes debido al trabajo adicional (separación de los animales infectados, tratamientos). La enfermedad se caracteriza por depresión, falta de apetito, fiebre, tos, trastornos nasales y dispepsia [11]. El tratamiento convencional para BRD es normalmente basado en una terapia antimicrobiana con la aplicación conjunta con mucolíticos y broncodilatadores [12]. Sin embargo, con el objetivo de reducir las respuestas inflamatorias, los antiinflamatorios esteroideos (AIE) y AINEs pueden ser administrados en combinación con terapia antibiótica parenteral [13, 14]. Los AIEs tienen actividad antiinflamatoria muy potente, pero también son potentes supresores de sistema inmune. Mientras, los AINEs no tienen efecto inmunosupresor en comparación con los AIEs y han demostrado su eficacia en inflamación y dolor. Varios AINEs, comercialmente disponibles, por ejemplo, flunixinina-meglumina (Finadyne®), ketoprofeno (Ketofen®), tolfenamida (Tolfedine®, Vetoquinol®) y Meloxicam (Metacam®) son licenciados para la administración parenteral con la indicación como terapia adjunta con antibióticos en mastitis e infecciones agudas.

Con el objetivo de desarrollar una formulación parenteral de terapia combinada para el tratamiento de mastitis e infecciones agudas en bovinos, equinos y porcinos, se seleccionaron la amoxicilina sódica (AMX) y el meloxicam (MLX).

AMX es un antibiótico  $\beta$ -lactámico semisintético derivado de la penicilina, el cual exhibe una actividad bactericida de amplio espectro contra Gram positivo y Gram negativo [15, 16, 17]. AMX puede ser indicado para la administración parenteral en muchas especies animales para el tratamiento de infecciones respiratorias, digestivas y dermatológicas [18]. Además, AMX representa buena distribución en la glándula mamaria [19, 20]. Por otro lado, según David y col. [21] AMX ha demostrado tener una actividad anti bactericida fuerte contra diferentes especies de staphylococcus y streptococcus como corinebacteria y escherichiacoli derivados de mastitis bovinas por ejemplo: inhibe el crecimiento de 80 % de 64 Staphylococcus aureus isolates a concentración de 1.56  $\mu\text{g/ml}$  y el crecimiento de 80 % de 61 escherichiacoli a concen-

tración de 6.25 µg/ml por lo tanto se puede indicar para el tratamiento de mastitis bovina.

MLX es un nuevo AINE del grupo inhibidor COX-2 [22]. La revisión bibliográfica revela numerosos estudios demostrando la efectividad de MLX en el tratamiento de mastitis y BRD. En el tratamiento de mastitis, una terapia combinada de MLX y antibióticos demostró más eficacia que un tratamiento de soporte como administración de oxitocina, de los fluidos intravenosos o extracción de leche [23]. En otro estudio se concluyeron que el tratamiento de MLX y un antibiótico parenteral para vaca lechera con síntomas de mastitis clínica producen menor aparición de células somáticas que son indicadoras de infección bacteriana en la leche. Además el tratamiento combinado reduce el riesgo de tener que sacrificar al animal en comparación con el tratamiento de antibiótico solo [24]. Para la BRD, varios estudios sugieren que el uso de MLX en una terapia conjunta con antibióticos es clínicamente más efectivo que flumetasona o flunixinina-meglumini, para modular las inflamaciones pulmonares [25]. Y además la eficacia en la combinación de MLX con un antibiótico para tratar BRD en vacas es superior que el tratamiento de antibiótico sólo o la combinación de antibiótico con flumetasona [26, 27].

En este capítulo se va a realizar una descripción de los fármacos utilizados en este trabajo, los cuales son amoxicilina sódica (AMX) como antibiótico contra las infecciones agudas en bovinos, equinos y porcinos, y meloxicam (MLX) que es un nuevo antiinflamatorio no esteroídico del grupo inhibidor COX-2 administrando conjuntamente con el antibiótico para mejorar la efectividad del tratamiento.

## **2.1. Meloxicam**

### **2.1.1. Descripción**

MLX es un AINE del grupo del ácido enólico. Tiene un amplio espectro de actividad antiinflamatoria con menos irritación gástrica y del tejido local que los otros AINEs existentes antes de su descubrimiento [21]. Se ha demostrado que el MLX es un potente inhibidor de COX-2 [27]. MLX es un polvo de color amarillo claro, inodoro o prácticamente inodoro [28].

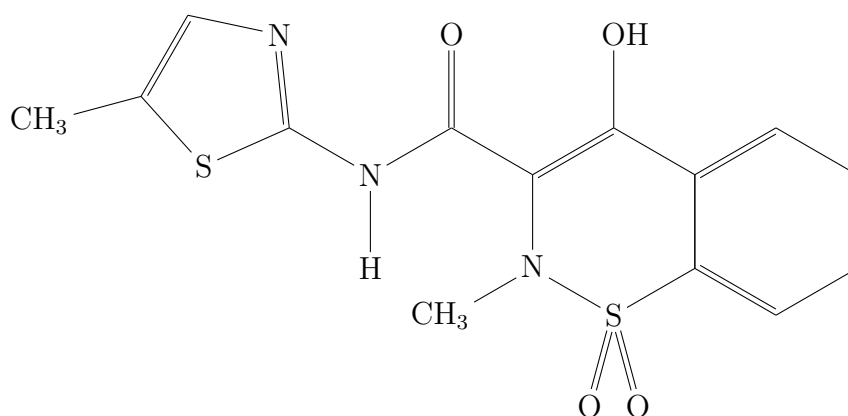


### 2.1.2. Estructura química y características físico químicas

MLX es 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-yl)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido (Fig 2.1). Su fórmula química es  $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$  y su peso molecular es 351.4 gramos/mol [29].

MLX es químicamente estable, no-higroscópico, no es fotosensible y log P (octanol-agua) 3,43. [30].

MLX puede ser extraído por la cristalización a partir de los solventes orgánicos como tetrahidrofurano. La estructura del MLX obtenida de esta forma es caracterizada por un equilibrio tautomérico de protones. pKa de MLX son 4,18 y 1,09 [21]. De esta forma, el comportamiento de ionización de MLX puede resumirse de la siguiente manera: en solución acuosa a pH mayor de 4.18, MLX es ionizado y la forma predominante es la forma aniónica; sin embargo a pH menor de 4.18, MLX puede existir en forma enólica o zwitterionica; en el caso de un medio muy ácido, se puede presentar en su forma catiónica.



**Figura 2.1.** Estructura química de MLX

La solubilidad acuosa de MLX es escasa [28]. La solubilidad en solución acuosa de los AINEs ácidos en el cual se incluye el MLX, es dependiente de pH: al reducir el pH causa un aumento en el ratio de fármaco no-ionizado a ionizado causando una disminución en la solubilidad. MLX es poco soluble en acetona, soluble en dimetilformamida, muy poco soluble en etanol 96 % y en metanol [28].

### 2.1.3. Propiedades farmacológicas

Grupo farmacoterapéutico: antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroídicos (oxicamas), código ATCvet: QM01AC06.

- *Propiedades farmacodinámicas*

MLX es un AINE del grupo de las oxicamas que actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, ejerciendo de este modo efectos antiinflamatorios, antiexudativos, analgésicos y antipiréticos. MLX también tiene propiedades antiendotóxicas ya que ha demostrado inhibir la producción de tromboxano B<sub>2</sub> inducido por la administración de endotoxina de *Escherichia coli* en terneros y cerdos.

- *Datos farmacocinéticos*

**Absorción:**

Después de una dosis única subcutánea de 0,5 mg de MLX/kg, se alcanzaron valores de C<sub>max</sub> de 2,1 µg /ml al cabo de 7,7 horas en terneros rumiantes. Después de una dosis única de 0,4 mg de MLX/kg por vía intramuscular, se alcanzó un valor de C<sub>max</sub> de 1,1 a 1,5 µg/ml en 1 hora en cerdos.

**Distribución:**

Más del 98 % del MLX se fija a las proteínas plasmáticas. Las mayores concentraciones de MLX se encuentran en hígado y riñón. Se detectan concentraciones comparativamente bajas en músculo esquelético y en grasa.

**Metabolismo:**

MLX se encuentra predominantemente en el plasma. En bovino, MLX es asimismo el producto mayoritario de excreción en la leche y la bilis, mientras que la orina contiene solamente trazas del compuesto inalterado. En cerdos, la bilis y la orina contienen solamente trazas del compuesto inalterado. MLX es metabolizado a un alcohol, un derivado ácido y a varios metabolitos polares. Se ha demostrado que todos los metabolitos principales son farmacológicamente inactivos.

**Eliminación:**

MLX tiene una semivida de eliminación de 26 horas tras la inyección subcutánea en terneros rumiantes. En cerdos, tras la administración intramuscular, la semivida de eliminación plasmática es de aproximadamente 2,5 horas. Aproximadamente el 50 % de la dosis administrada se elimina por la orina y el resto por las heces.

#### **2.1.4. Indicaciones**

- *Bovino*

Para uso en infecciones respiratorias agudas con terapia antibiótica adecuada

para reducir los síntomas clínicos en bovino.

Para el tratamiento de mastitis aguda como una terapia auxiliar, en combinación con terapia antibiótica.

La administración es por vía subcutánea o intravenosa a una dosis de 0,5 mg de MLX/kg peso vivo (equivalente a 10,0 ml/100 kg peso vivo).

- *Cerdo*

Para uso en trastornos no infecciosos del aparato locomotor para reducir los síntomas de cojera e inflamación.

Como terapia auxiliar en el tratamiento de la septicemia y la toxemia puerperal (síndrome mastitis-metritis-agalactia) con terapia antibiótica adecuada.

La administración es única intramuscular a una dosis de 0,4 mg de MLX/ kg peso vivo (equivalente a 2,0 ml/ 25 kg peso vivo). En caso necesario, se puede administrar una segunda dosis de MLX después de 24 horas.

- *Ovino*

Para aliviar la inflamación y el dolor en trastornos músculo-esqueléticos agudos y crónicos. Para el alivio del dolor asociado al cólico equino.

Inyección única intravenosa a dosis de 0,6 mg de meloxicam/kg peso vivo.

## 2.2. Amoxicilina

### 2.2.1. Descripción

AMX es un antibiótico  $\beta$ -lactámico de amplio espectro perteneciente al grupo de las aminopenicilinas. Químicamente es similar a la ampicilina.

Es un polvo muy blanco o casi blanco muy higroscópico.

AMX existe en el mercado en dos formas, que son las siguientes:

- soluble en disolventes acuosos: AMX de sodio.
- insoluble en disolventes acuosos: AMXtrihidrato.

### 2.2.2. Características físico químicas de AMX sódica

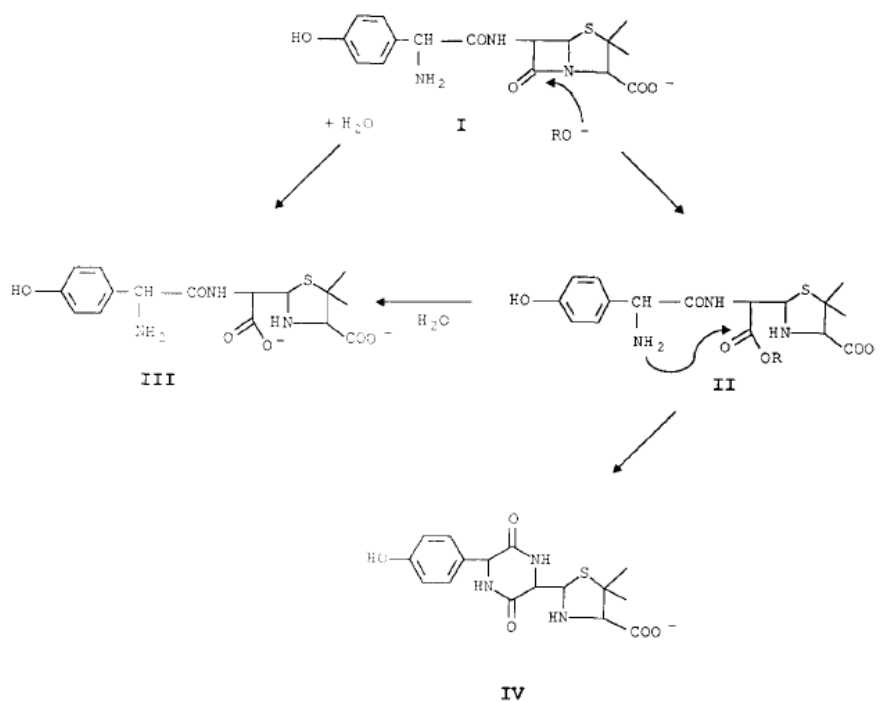
**Solubilidad:** Muy soluble en agua, bastante soluble en etanol, muy poco soluble en acetona y prácticamente insoluble en cloroformo y éter [31].

**Conservación:** En un envase hermético. Si la sustancia es estéril, en un envase estéril, hermético y con cierre inviolable [32].

**Estabilidad:** La degradación de AMX es la típica que sufren todas las penicilinas. En medio alcalino se descompone inicialmente por apertura del anillo  $\beta$ -lactámico, y se convierte en ácido peniciloico. Este último compuesto pierde  $\text{CO}_2$  y forma ácido peniloico. En medio ácido AMX se hidroliza primero a ácido penicilánico, el cual absorbe a 320 nm, y sirve como reacción para distinguir entre AMX y ampicilina. Compuestos que se forman en posteriores hidrólisis son: ácido penílico, ácido penáldico, penicilamina y peniloaldheído.

Las sustancias en las que se degrada AMX son las siguientes: ácido 6 - aminopenicilánico; (5S) ácido amoxiloico y (5R) ácido amoxiloico; (5S, 6R) ácido amoxiciloico y (5R, 6R) ácido amoxiciloico; L-amoxicilina; 2 - hidroxí - 3 - (4 - hidroxí) fenilpirazina; 4 - hidroxifenilglicilamoxicilina; amoxicilina (5R) piperazina-2',5'-diona y amoxicilina (5S) piperazina-2',5'-diona; N-pivaloil-4-hidroxifenil-glicina y dímero de amoxicilina [33].

La AMX materia prima seca, y los polvos de administración oral secos, y cápsulas pueden mantener su actividad durante 5 años, aunque las fechas de caducidad suelen ser de 3 años [34].



**Figura 2.2.** Mecanismo nucleofílico de degradación de la amoxicilina sódica: (I) amoxicilina sódica; (II) amoxiciloilester; (III) ácido amoxiciloico; (IV) piperazinediona [35].

### 2.2.3. Propiedades farmacológicas

AMX tiene acción bactericida y actúa frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, inhibiendo la biosíntesis y reparación de la pared mucopéptida bacteriana. Código ATC vet: QJ01CA- Penicilinas de amplio espectro.

#### ■ Propiedades farmacodinámicas

**Mecanismo de acción:** El mecanismo de la acción antibacteriano de la AMX consiste en la inhibición de los procesos bioquímicos de síntesis de la pared bacteriana, mediante un bloqueo selectivo e irreversible de diversas enzimas implicadas en tales procesos, principalmente transpeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas. La inadecuada formación de la pared bacteriana, en las especies susceptibles, produce un desequilibrio osmótico que afecta especialmente a las bacterianas en fase de crecimiento (durante la cual los procesos de síntesis de pared bacteriana son especialmente importantes), que conduce finalmente a la lisis de la célula bacteriana.

**Espectro de acción:** Entre las especies consideradas sensibles a la AMX destacan.

#### Bacterias Gram-positivas:

- Estafilococos no productores de penicilinasa (cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp.)
- Estreptococos (*Streptococcus* spp.).
- Clostridios (*Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium* spp.).
- *Arcanobacterium* spp.
- *Bacillus anthracis*.
- *Listeria monocytogenes*.
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

#### Bacterias gram negativas:

- *Pasteurella* spp.
- *Mannheimia haemolytica*.
- *Haemophilus* spp.

- Actinobacillus spp.
- Escherichia coli.
- Salmonella spp.
- Moraxella spp.
- Fusobacterium spp.

El principal mecanismo de resistencia bacteriana a AMX es la producción de betalactamasas, enzimas que provocan la inactivación de su efecto mediante la hidrólisis del anillo betalactámico obteniéndose de este modo el acidopeniciloico, compuesto estable pero inactivo.

### ■ Propiedades farmacocinéticas

La absorción de AMX por vía oral es independiente de la ingesta de alimentos y las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan rápidamente en la mayoría de las especies animales entre 1 y 2 horas después de la administración del producto.

AMX presenta una baja unión a proteínas plasmáticas y difunde rápidamente a la mayoría de los líquidos y tejidos corporales. Esta difusión se extiende a los derrames sinoviales, a los líquidos de expectoración y al tejido linfático. La difusión es tanto más satisfactoria en los líquidos resultantes de un proceso inflamatorio.

El metabolismo de AMX se limita a la apertura del anillo betalactámico por hidrólisis, lo que conduce a la liberación del ácido peniciloico inactivo (20 %). Las biotransformaciones tienen lugar en el hígado.

AMX se distribuye esencialmente en el compartimento extracelular. Su distribución hacia los tejidos viene facilitada por el débil índice de unión a proteínas plasmáticas.

La vía mayoritaria de eliminación para AMX es renal en forma activa. También se excreta en pequeñas cantidades por leche y bilis.

### *Bovino*

La biodisponibilidad absoluta de AMX tras la administración intramuscular es del 97 %.

### *Ovino*

Tras la administración intravenosa, AMX se distribuye rápidamente a los tejidos, observándose un volumen de distribución en estado de equilibrio de 0,2 l/kg en ovejas y 0,5 l/kg en cabras, un aclaramiento de 0,7 l/h/kg en ovejas y 1 l/h/kg en cabras y una semivida de eliminación plasmática de una hora en ambas especies.

Tras la administración intramuscular, tanto en ovejas como en cabras, la concentración máxima se alcanzó una hora después de su administración. La biodisponibilidad fue de un 95 %. Una semivida de eliminación plasmática es de una hora.

#### *Porcino*

Tras la administración intravenosa, se observa un volumen de distribución en estado de equilibrio de 0,5 l/kg, y un aclaramiento igual a 0,4 l/h/kg, la semivida de eliminación plasmática fue de 1,8 h.

Tras la administración intramuscular, la concentración máxima alcanza en unas 2 horas. La biodisponibilidad es de un 80 %.

#### **2.2.4. Indicaciones**

Infecciones causadas por bacterias sensibles localizadas en

- El tracto digestivo.
- El tracto respiratorio
- El tracto urogenital
- Piel y tejidos blandos.

Dosificación: para todas las especies, vía intramuscular: 10 mg AMX/kg.

## **Bibliografía**

- [1] J. Danuser, J. Luginbuhl, and D. Gaillard, "Disease and reasons for culling in Swiss dairy cows. I. Inquiry, frequencies and repeatabilities of causes of treatment," *Mitt. Schweiz. Heiz-U Maschverb.*, vol. 25, pp. 98–102, 1987.

- [2] G. Ziv, "Distribution of several labeled antibacterial agents in the udder as measured by contact autoradiographic methods," *Refu. Vet.*, vol. 35, pp. 32–33, 1978.
- [3] N. Craven, "Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation—a review.," *The British veterinary journal*, vol. 143, pp. 410–22, Jan. 1987.
- [4] P. Gwynn, "Some alternatives to antibiotics," in *Proceedings of the 4th British mastitis Conference*, (Stoneleigh, UK), pp. 36–41, 1991.
- [5] D. Boothe, "The analgesic anti-inflammatory drugs," in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (A. H.R., ed.), pp. 432–449, Iowa State University Press, 7th ed., 1995.
- [6] P. Lees and S. May, "Inflammation and anti-inflammatory drugs," in *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle* (A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd, and R. G. Eddy, eds.), Wiley-Blackwell, 2004.
- [7] L. H. Sumano, *Farmacología Clínica en Bovinos*. Mexico D.F.: Editorial Trillas, editorial ed., 1995.
- [8] T. B. Barragry and T. E. Powers, *Veterinary Drug Therapy*. Lea & Febiger, 1994.
- [9] L. H. Sumano and C. L. Ocampo, *Farmacologia Veterinaria*. Mexico D.F.: Mc Graw-hill, 1988.
- [10] R. Nicholas and R. Ayling, "Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control," *Research in Veterinary Science*, vol. 74, pp. 105–112, Apr. 2003.
- [11] A. H. Andrews, "," *Cattle Practice*, vol. 8, no. 2, pp. 109–113, 2000.
- [12] E. H. Shim, R. D. Shanks, and D. E. Morin, "Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows.," *Journal of dairy science*, vol. 87, pp. 2702–8, Aug. 2004.
- [13] S. McDougall, M. A. Bryan, and R. M. Tiddy, "Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis.," *Journal of dairy science*, vol. 92, pp. 4421–31, Sept. 2009.



- 
- [14] L. L. F. Mendonca, "Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause for reversible infertility," *Rheumatology*, vol. 39, pp. 880–882, Aug. 2000.
- [15] R. Sutherland and G. N. Rolinson, " $\alpha$ -amino- $\rho$ -hydroxybenzylpenicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin: in vitro evaluation," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 10, pp. 411–5, Jan. 1970.
- [16] R. Sutherland, E. A. Croydon, and G. N. Rolinson, "Amoxycillin: a new semi-synthetic penicillin," *British medical journal*, vol. 3, pp. 13–6, July 1972.
- [17] H. Agersø, C. Friis, and J. P. Nielsen, "Penetration of amoxycillin to the respiratory tract tissues and secretions in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs," *Research in Veterinary Science*, vol. 64, pp. 251–257, May 1998.
- [18] G. H. Yeoman, "Microbiology and bioavailability of amoxicillin," *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, vol. 4, no. suppl, pp. 720–738, 1977.
- [19] J. Baggot, "Systemic antimicrobial therapy," in *Pharmacological Basis of Large Animal Medicine* (J. Bogan, ed.), Blackwell Science Ltd, 1983.
- [20] G. Ziv, "Pharmacokinetic concepts for systemic and intramammary treatment in lactating and dry cows," in *Proc. Int. Dairy Fed.* (F. Dodd, T. Griffin, and R. Kignwall, eds.), pp. 314–340, 1975.
- [21] W. J. David, N. G. Ruben, L. C. Kerry, L. G. Linda, and T. G. Yrjö, "Comparison of Seven Antibiotic Treatments with No Treatment for Bacteriological Efficacy Against Bovine Mastitis Pathogens," *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 1664–1670, Aug. 1999.
- [22] Eglitis R.I., Kuklja M.M., Kotomin E.A., Stashans A., Popov A.I., Arqueros F., Karle A., Lorenz E., Martinez S., Plaga R., Rozanska M., Luger P., Daneck K., Engel W., Trummlitz G., and Wagner K., "Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 3, p. 13, 1996.
- [23] A. C. Hirsch and H. Philipp, "Effects of meloxicam on reproduction parameters in dairy cattle," *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, vol. 32, pp. 566–70, Dec. 2009.

- [24] D. Bednarek, A. Szuster-Ciesielska, B. Zdzisińska, M. Kondracki, R. Paduch, and M. Kandefer-Szerszeń, “The effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on the cellular immunity of calves with experimentally-induced local lung inflammation,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 71, pp. 1–15, Oct. 1999.
- [25] G. M. Friton, C. Cajal, and R. Ramirez, “Clinical efficacy of meloxicam (Metacam) and flunixin (Finadyne) as adjuncts to antibacterial treatment of respiratory disease in fattening cattle,” *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, vol. 117, pp. 304–309, 2004.
- [26] D. Bednarek, A. Szuster-Ciesielska, B. Zdzisinska, M. Kondracki, R. Paduch, and M. Kandefer-Szerszen, “A comparative study of the effects of meloxicam and flunixin meglumine (NSAIDs) as adjunctive therapy on interferon and tumor necrosis factor production in calves suffering from enzootic bronchopneumonia,” *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 6, pp. 109–115, 2003.
- [27] D. Bednarek, B. Zdzisińska, M. Kondracki, and M. Kandefer-Szerszeń, “Effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in combination with long-acting oxytetracycline on non-specific immunity of calves suffering from enzootic bronchopneumonia,” *Veterinary Microbiology*, vol. 96, pp. 53–67, Oct. 2003.
- [28] *British Pharmacopeia 2007*. London: Data © Crown Copyright, Index+ System Simulation Ltd., 2006.
- [29] G. Friton and E. Salamon, “Meloxicam in veterinary medicine,” 2005.
- [30] *Clarke’s Analysis of Drug and Poison*. Great Britain: © Pharmaceutical Press, third ed., 2005.
- [31] Q. A. Xu and L. A. Trissel, *Stability-Indicating Hplc Methods for Drug Analysis*. London, England: Pharmaceutical Press, 1999.
- [32] *Real farmacopea Española*. Madrid, Spain: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008.
- [33] L. Valvo, L. Manna, R. Alimenti, S. Alimonti, P. Bertocchi, and E. Ciranni, “Amoxicillin sodium–potassium clavulanate: evaluation of gamma radiation

- induced effects by liquid chromatography on both the individual drugs and their combination,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 21, pp. 9–14, Oct. 1999.
- [34] P. Bhattacharyya and M. Winifred, “Amoxicillin,” in *Analytical profiles of drug substances. Vol. 7* (K. Florey, ed.), pp. 20–41, Academic Press, Inc., 1978.
- [35] L. Valvo, S. Alimonti, R. Alimenti, C. De Sena, E. C. Signoretti, R. Draisci, and L. Giannetti, “Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 15, pp. 487–93, Jan. 1997.

## Capítulo 3

# Solubilizantes Utilizados en el Desarrollo Farmacéuticos

MLX es prácticamente insoluble en agua. La pobre solubilidad de MLX puede traer muchas dificultades a la hora de desarrollar las formulaciones farmacéuticas y además causa la variabilidad en cuanto a su biodisponibilidad. Por lo tanto uno de los objetivos del presente trabajo consiste en aumentar la solubilidad acuosa de MLX.

Existen varios métodos para mejorar la solubilidad de fármacos según Myrdal and Yalkowsky [1] que consisten en cosolvencia, ionización, complejación, hidrotropismo y micelización con agentes surfactantes. Se ha observado aumento de la solubilidad acuosa de MLX mediante el control de pH, uso del cosolventes o formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Estudios presentados por NeelamSeedler y col. [2] y H. A. El-Maradny y col. [3] demuestran el aumento de la solubilidad acuosa de MLX en el medio básico y en el sistema de cosolvente PEG 400-etanol, también en presencia de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

La cosolvencia consiste en la mezcla de los cosolventes orgánicos para solubilizar el fármaco, en nuestro caso no es la técnica más adecuada por tratarse de formulaciones liofilizadas.

Por lo tanto se estudiaron la solubilidad de MLX con los solubilizantes adecuados para el posterior proceso de liofilización, tales como, agentes surfactantes, azúcares, polímeros hidrofílicos, sacarina sódica y derivado de ciclodextrina (2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina).

A continuación, se hace la descripción de los solubilizantes utilizados durante el proceso de desarrollo farmacéutico.

### 3.1. Surfactantes no iónicos

Los agentes activos superficiales o surfactantes son moléculas que contienen un segmento liposoluble y otro hidrosoluble. La solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interfase. Y la tensión superficial de una solución surfactante disminuye gradualmente al aumentar la concentración, debido a que penetran más moléculas de surfactantes en la capa superficial o de superficie de contacto. Sin embargo, a una concentración determinada esta capa se satura y se produce otra forma de protección del grupo hidrófobo del surfactante frente al medio acuoso que consiste en la formación de agregados, denominados micelas. Se denomina concentración micelar crítica o CMC a la concentración a la que empiezan a formarse las micelas en una solución [4]. El mecanismo de solubilización de muchos fármacos poco solubles es disminuir el potencial químico de las moléculas en la solución o bien por la captación en sus micelas cuando la concentración de surfactantes alcanza su mínima concentración micelar (CMC) [5].

Los surfactantes pueden ser clasificados por la carga iónica de la parte superficialmente activa de la molécula: los surfactantes aniónicos, los catiónicos, y los no iónicos. Entre estas clases, se han demostrado que los surfactantes no-iónicos son los menos tóxicos y aptos para el uso parenteral por las agencias regulatorias [6]. También tienen un mayor grado de compatibilidad con otros materiales que los surfactantes aniónicos y catiónicos, y son menos sensibles a los cambios de pH o a la adición de electrólitos [4]. La mayoría de los surfactantes no iónicos se basan en: un ácido graso o alcohol, cuya cadena hidrocarbonada proporciona a la molécula las características hidrofóbicas; un alcohol o un grupo oxido de etileno que proporciona a la molécula las características hidrófilas.

Los surfactantes no-iónicos usados en nuestro trabajo son: polisorbato 80 (Tween 80®), lecitina de soja y sorbitántrilaurato (Span 85®). Polisorbato 80 (Tween 80®) es una mezcla de esteres parciales de sorbitol y sus mono-, di-anhídridos condensados con un número aproximado de moles de óxido de etileno, son miscibles con agua. Sorbitántrilaurato (Span 85®) es un éster de sorbitán, se comercializa la mezcla de ésteres parciales de sorbitol y sus mono, di-anhídridos de ácido oleico. Lecitina de soja es una mezcla de los fosfolípidos y otros materiales como triglicéridos, carbohidratos y ácidos grasos. Son usados en las formulaciones parenterales con las concentraciones máximas de 10,0 %, 10,0 % y 2,3 % (p/v) respectivamente [7].

### 3.2. Azúcares

Forman un grupo de compuestos que contienen carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O). Son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. De los glúcidos más sencillos o monosacáridos, el más importante es la glucosa [7]. Manitol y sorbitol son edulcorantes denominados polioles o polialcoholes. Son usados ampliamente en las formulaciones farmacéuticas de las administraciones tanto parenteral, oral y en forma de aerosoles ya que son sustancias bien estudiadas toxicológicamente. Las funciones que realizan en las formulaciones son las siguientes: diluyentes, edulcorantes, agente de tonicidad y especialmente en los liofilizados se usa como crioprotectores, es decir protegen los principios activos durante el proceso de congelación y sublimación, de esta forma mantiene las propiedades farmacológicas de las sustancias activas [8]. Además, se usan los azúcares para solubilizar los fármacos pocos solubles debido a las posibles interacciones de la estructura molecular de fármacos con los grupos hidroxilos de estas sustancias [9].

### 3.3. Polímeros hidrofílicos: carboxilmetil celulosa

La carboximetilcelulosa es un polímero de alto peso molecular (90.000- 700.000) que se obtiene a partir de la celulosa al reaccionar con ácido monocloroacético e hidróxido sódico (NaOH). La estructura de la carboximetilcelulosa se basa en el polímero de la celulosa  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranososa. Existen diferentes grados de sustitución del polímero pero en general es de 0,6- 0,95 sustituciones por unidad monomérica.

Propiedades físico-químicas: es completamente soluble en agua a todas las temperaturas, e insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos.

Aplicaciones en tecnología farmacéutica:

- Agente emulsificante: en porcentajes de 0,25- 1,0 %.
- Agente gelificante: 4,0- 6,0 %.
- Agente aglutinante: 1- 6 % en solución acuosa, o sólido a requerimiento.

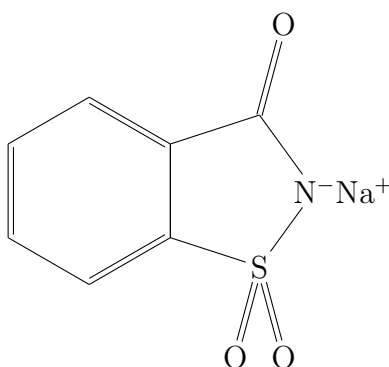
En este caso se emplea como agente solubilizante debido a su naturaleza hidrofílica con la concentración máxima apta para uso parenteral 5 %

### 3.4. Sacarina sódica

La sacarina sódica es un edulcorante que es empleado ampliamente tanto en la industria alimentaria como farmacéutica. Es un polvo blanco, cristalino y eflorescente con un sabor intensamente dulce. Por otro lado, sacarina sódica debido a su naturaleza se puede usar como un hidrotropo para solubilizar los fármacos. El hidrotropismo es un proceso de solubilización en el cual la agregación de un soluto aumenta la solubilidad de otro soluto [10]. Los hidrotropos típicamente consisten en una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica (similar a los surfactantes) pero la parte hidrofóbica es generalmente tan pequeña que causa una auto-agregación espontánea [11]. Además la sacarina se puede usar para formar los co-cristales con los fármacos para aumentar su solubilidad según Rahul et col. [12].

Aplicaciones en tecnología farmacéutica:

- Soluciones orales: 0,075-0,6 %.
- Pastas y geles dentales: 0,12- 0,3 %
- Inyecciones IM/IV: 0,9 % .



**Figura 3.1.** Estructura química de sacarina sódica

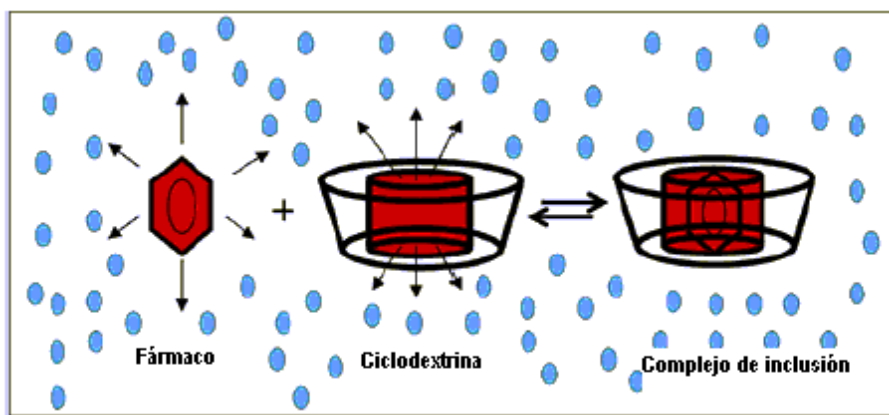
### 3.5. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos no reductores, constituidos por 6, 7, u 8 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos entre los carbonos C1 y C4, que se denominan  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente (Fig. 3.2). Las ciclodextrinas se obtuvieron por primera vez por Villiers, en 1891, a partir de la degradación del almidón [13]. Sobre la estructuras de las dextrinas, el

grupo  $-OH$  (C2) puede formar puentes de hidrógeno con el  $-OH$  (C3) adyacente en la unidad de glucopiranososa, dando rigidez a la estructura. Por lo tanto el anillo de las dextrinas en realidad es un cilindro cónico, frecuentemente caracterizado como un cono truncado (Fig. 3.3) [14]. Por la distribución de los grupos funcionales, la molécula de ciclodextrina adquiere carácter hidrofílico en la parte externa y apolar en la interna (139).

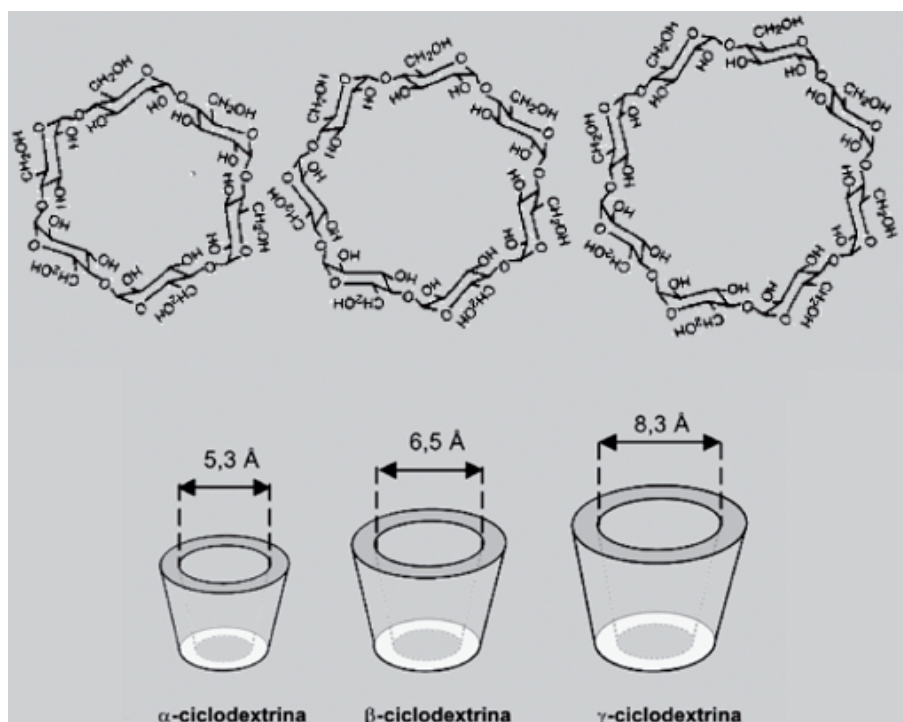
Las ciclodextrinas tienen gran interés en la industria farmacéutica ya que una de sus ventajas es favorecer la solubilidad de muchos fármacos poco solubles en agua. El mecanismo de las ciclodextrinas para mejorar la solubilidad de los fármacos en agua es distinto que otros cosolventes ya que pueden interactuar con los principios activos para formar los complejos de inclusión. La cavidad interior de las ciclodextrinas es hidrófoba, por lo que estos compuestos son capaces de albergar moléculas hidrófobas más pequeñas para formar complejos “anfitrión-huésped”, en los que la molécula huésped queda encapsulada por la ciclodextrina. La formación del complejo fármaco-ciclodextrina normalmente es por la relación 1:1 (Fig. 3.3) [14].

Sin embargo el uso de ciclodextrinas en las formulaciones parenterales está un poco restringido debido a su posible toxicidad renal (15). Recientemente dos formas modificadas de ciclodextrinas que son sulfobutileter- $\beta$  ciclodextrina y hidroxipropil- $\beta$  ciclodextrina han demostrado formar buenos complejos de inclusión y poseen una máxima seguridad in vivo para las aplicaciones biomédicas [15].



**Figura 3.3.** Equilibrio de unión de fármaco con una ciclodextrina para formar un complejo de inclusión 1:1 [17].





**Figura 3.2.** Estructuras químicas y las dimensiones de la cavidad de las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  ciclodextrinas [16].

## Bibliografía

- [1] P. B. Myrdal and S. H. Yalkowsky, "Solubilization of drugs," in *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (J. Swarbrick and J. Boylan, eds.), vol. 18, pp. 161–217, New York: Dekker, 1998.
- [2] N. Seedher and S. Bhatia, "Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, p. E33, Jan. 2003.
- [3] H. A. EL-MARADNY, S. A. MORTADA, O. A. KAMEL, and A. H. HIKAL, "Characterization of ternary complexes of meloxicam-HP $\beta$ CD and PVP or L-arginine prepared by the spray-drying technique," *Acta pharmaceutica*, vol. 58, no. 4, pp. 455–466, 2008.
- [4] M. Aulton, *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Madrid, Spain: Elsevier, 2004.
- [5] S. Sweetana and M. J. Akers, "Solubility Principles and Practices for Parenteral Drug Dosage Form Development," *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 50, pp. 330–342, Sept. 1996.

- [6] K. W. Reed and S. H. Yalkowsky, "Lysis of Human Red Blood Cells in the Presence of Various Cosolvents," *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 39, pp. 64–69, Mar. 1985.
- [7] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press, 2006.
- [8] R. E. Johnson, C. F. Kirchhoff, and H. T. Gaud, "Mannitol-sucrose mixtures—versatile formulations for protein lyophilization.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 91, pp. 914–22, Apr. 2002.
- [9] M. A. Etman and V. F. Naggar, "Thermodynamics of paracetamol solubility in sugar-water cosolvent systems," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 58, pp. 177–184, Feb. 1990.
- [10] J. Lee, S. C. Lee, G. Acharya, C.-j. Chang, and K. Park, "Hydrotropic solubilization of paclitaxel: analysis of chemical structures for hydrotropic property.," *Pharmaceutical research*, vol. 20, pp. 1022–30, July 2003.
- [11] D. Balasubramanian, V. Srinivas, V. G. Gaikar, and M. M. Sharma, "Aggregation behavior of hydrotropic compounds in aqueous solution," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 93, pp. 3865–3870, May 1989.
- [12] R. Banerjee, P. M. Bhatt, N. V. Ravindra, and G. R. Desiraju, "Saccharin salts of active pharmaceutical ingredients, their crystal structures, and increased water solubilities," Nov. 2005.
- [13] I. Rodríguez Galan, "Ciclodextrinas," in *Tratado de farmacia galénica* (Faulí i Trillo, C. and M. Aroztegui Trenchs, eds.), pp. 211–218, Luzán 5, 1993.
- [14] J. Szejtli, "Molecular Encapsulation by Ciclodextrins," tech. rep., Budapest, 1997.
- [15] D. W. Frank, J. E. Gray, and R. N. Weaver, "Cyclodextrin nephrosis in the rat.," *The American journal of pathology*, vol. 83, pp. 367–82, May 1976.
- [16] A. Biwer, G. Antranikian, and E. Heinzle, "Enzymatic production of cyclodextrins.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 59, pp. 609–17, Sept. 2002.

- [17] V. J. Stella and Q. He, “Cyclodextrins,” *Toxicologic pathology*, vol. 36, pp. 30–42, Jan. 2008.

## Capítulo 4

# Materiales y Métodos

### 4.1. Materiales

Para facilitar su localización se ha agrupado el material en:

- Materias primas.
- Reactivos empleados.
- Disoluciones utilizadas.

#### 4.1.1. Materias primas

- ⇒ AMX sódica BP/USP. Panreac<sup>®</sup> S.A (España).
- ⇒ Carboximetilcelulosa sódica. Cofares<sup>®</sup> (España)
- ⇒ D (-) glucosa. Panreac<sup>®</sup> S.A (España).
- ⇒ Glicina. Panreac<sup>®</sup> S.A (España).
- ⇒ Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Cofares<sup>®</sup> (España).
- ⇒ Lecitina de soja. Guinama<sup>®</sup> (España).
- ⇒ Manitol. Panreac<sup>®</sup> S.A (España).
- ⇒ MLX BP. Fagron Ibérica<sup>®</sup> (España).
- ⇒ Polisorbato 80: Tween 80<sup>®</sup>. Guinama<sup>®</sup> (España).
- ⇒ Sacarina sódica: Panreac<sup>®</sup> S.A (España).
- ⇒ Sorbitan trioleato: Span 85<sup>®</sup>. Sigma<sup>®</sup> (Alemania).
- ⇒ Sorbitol. Panreac<sup>®</sup> S.A (España).

#### 4.1.2. Reactivos empleados

- ⇒ Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Ácido orto-fosfato. Calidad PA (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Acetato sódico PRS (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Acetonitrilo PRS (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Dihidrógeno fosfato de potasio PRS (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Hidróxido sódico PRS (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Metanol (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).
- ⇒ Trietilamina (Panreac<sup>®</sup> Química S.A., Barcelona).

#### 4.1.3. Disoluciones utilizadas

- ⇒ Tampón PBS pH 7,4 según la USP 33 [1]: se añaden 50 ml de una disolución de dihidrógeno fosfato de potasio 0,2 M y 39,1 ml de una disolución de hidróxido sódico 0,2 M en un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con agua destilada.
- ⇒ Tampón pH 8,8: se prepararon tres tipos de tampón pH 8,8 cambiando las cantidades de glicina e hidróxido sódico:
  - a. Tampón pH 8,8 tipo 1: tampón pH 8,8 de glicina 0,023 M: se pesan 1750 mg de glicina y se añaden 1,82 ml de disolución de hidróxido sódico 1 M en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada.
  - b. Tampón pH 8,8 tipo 2: tampón pH 8,8 de glicina 0,027 M: se pesan 2000 mg de glicina y se añaden 2,43 ml de disolución de hidróxido sódico 1M en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada.
  - c. Tampón pH 8,8 tipo 3: pH 8,8 de glicina 0,033 M: se pesan 2500 mg de glicina y se añaden 4,0 ml de disolución de hidróxido sódico 1 M en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada.
- ⇒ Tampón pH 9,8: se pesan 1750 mg de glicina y se añaden 10,0 ml de disolución de hidróxido sódico 1M en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada.
- ⇒ Tampón pH 11,2: se pesan 1750 mg de glicina y se añaden 19,2 ml de disolución de hidróxido sódico 1M en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada.

## 4.2. Instrumental

- ⇒ Agitador magnético-calefactor (Velp científica<sup>®</sup>, Alemania).
- ⇒ Balanza Mettler<sup>®</sup> AG 104 (Mettler-Toledo<sup>®</sup> GmbH, Suiza).
- ⇒ Balanza Microanalítica Sartorius<sup>®</sup> M5P Serie 30303388.
- ⇒ Baño termostatzado de agitación. Memmert<sup>®</sup> modelo WB22 (Alemania).
- ⇒ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Jasco (Tokyo, Japón) modular que consta de: Bomba Jasco PU-1580, detector UV Jasco UV-1575, autoinyector Gilson 231 XL (Middleton, WI, U.S.A.) e integrador Borwin<sup>®</sup>.
- ⇒ Equipo de análisis de calorimetría diferencial de barrido: Mettler<sup>®</sup> 4.000.
- ⇒ Equipo de determinación de partículas: Microtrac Zetatrak (USA).
- ⇒ Equipo de difracción de rayos X: Philips XPERT<sup>®</sup>.
- ⇒ Equipo de liofilización: Telstar<sup>®</sup> Cryobloc<sup>®</sup> 764 (Tarrasa).
- ⇒ Espectrofotómetro UV-Vis Pharma Spec<sup>®</sup> UV-1700.
- ⇒ Espectroscopio infrarrojo con Transformada (o desarrollo en serie) de Fourier (IR-TF) Perkin<sup>®</sup>, modelo Paragon 1000.
- ⇒ Estufas termostatzadas: Radiber S.A., Minidigit II.
- ⇒ Nevera programada a 4°C. Corbero<sup>®</sup>.
- ⇒ pHmetro Mettler Toledo<sup>®</sup> MP230.

## 4.3. Métodos analíticos

A continuación se describen las distintas técnicas analíticas empleadas en este trabajo. Con el fin de facilitar su localización se han clasificado en:

- Método empleado en la determinación de coeficiente de solubilidad de MLX en diferentes medios, con los excipientes.
- Método empleado en la preparación de las distintas formulaciones, y el proceso de liofilización.
- Métodos empleados en la caracterización de las formulaciones: reconstitución, rendimiento y determinación de las formulaciones.
- Métodos empleados en la caracterización física de las materias primas y formulaciones: difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja y análisis de calorimetría diferencial de barrido.

- Técnicas analíticas para la cuantificación de MLX en los estudios de preformulación y cuantificación de MLX y AMX en las diferentes formulaciones seleccionadas: espectrofotometría U.V.
- Métodos empleados en los ensayos de determinación de inocuidad de las formulaciones *in vitro*: prueba de precipitación y estudio de hemólisis *in vitro*.
- Diseño de estudio de estabilidad de las formulaciones y las técnicas analíticas para la cuantificación de MLX y AMX en el estudio de estabilidad: cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Diseño de estudios farmacocinéticos de las formulaciones y las técnicas analíticas para la cuantificación de MLX y AMX (HPLC).

#### 4.3.1. Método empleado en la determinación de coeficiente de solubilidad de MLX

La AMX sódica es totalmente soluble en agua, y en disoluciones acuosas. Diseñar una formulación liofilizada que contenga MLX es un gran reto debido a que este fármaco presenta muy poca solubilidad en agua (0,013 mg/ml). Por lo tanto en el estudio de preformulación, se realizan las pruebas de solubilidad de MLX con diversos excipientes adecuados para uso parenteral [2, 3]: surfactantes (polisorbato 80, sorbitan trioleato, lecitina de soja), azúcares (D(-) glucosa, manitol, sorbitol), sacarina sódica y polímeros (carboximetil celulosa sódica) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en tampones con un rango de pHs de 7,4 a 11,2.

Los estudios de solubilidad fueron realizados de acuerdo al método descrito por N. Seedler y S. Bhatia [4] y P.R. Sathesh Babu y col [5]. Se emplearon diferentes cantidades de los distintos excipientes disueltos previamente en 2 ml de los siguientes medios de disolución: agua destilada, tampón PBS de pH 7,4, tampón glicina/ hidróxido sódico de pHs 8,8; 9,8 y 11,2. A continuación un exceso de MLX fue añadido a todos los tubos de ensayo que contenían las disoluciones de excipientes. Se ajustó el pH final de las muestras que contenían hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, debido a que este excipiente causaba una disminución de los valores de pH [6]. Los tubos de ensayo se colocaron en un baño de agitación a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

Las disoluciones obtenidas fueron filtradas a través de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  y diluidas con tampón fosfato pH 7,4.

La cantidades de MLX obtenidas en las distintas muestras fueron determinadas por espectrofotometría UV normal a la longitud de onda de máxima absorción del principio activo (361nm). En cambio, para las muestras que contenían lecitina de soja por espectrofotometría UV de primera derivada a 335nm, ya que este excipiente interfería en la lectura del principio activo en el modo de absorción normal a 361nm.

#### **4.3.2. Métodos empleados en la preparación de las formulaciones**

##### **Preparación de las formulaciones**

Se realizó en dos etapas que se describen a continuación:

*En la primera se realizaron los estudios de preformulación, preparando formulaciones de MLX a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de solubilidad y se procedió también a su caracterización.*

*En la segunda fase se preparan formulaciones con ambos principios activos (MLX y AMX) a partir de las formulaciones seleccionadas en la primera fase.*

En la primera etapa se obtienen las formulaciones de MLX con concentraciones de principio activo de 5 mg/ml. Éstas se preparan de la manera siguiente: se disuelven 50 mg de MLX en 10 ml de los medios apropiados con las concentraciones adecuadas de excipientes (ver Tabla 4.1) y se someten al proceso de liofilización.

En la segunda etapa del estudio, se preparan las formulaciones con ambos principios activos (MLX y AMX). El método de preparación de las formulaciones finales es el siguiente: se disuelven 50 mg de MLX en 10 ml del tampón glicina/ hidróxido de sodio pH 8,8 con uno de los excipientes seleccionados (sacarina sódica o hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), se incorpora 1000 mg de AMX en la disolución de MLX y finalmente se somete al mismo proceso de liofilización que las formulaciones anteriores.



**Tabla 4.1.** Formulaciones seleccionadas en la primera etapa preparada solo con MLX y formulaciones finales con ambos principios activos (MLX y AMX).

Etapas	Formulaciones	Principios activos	Excipientes (%)	Medios de disolución
Etapa 1	MLX:CD	MLX	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (7,5 %)	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M
	MLX:Sacarina	MLX	Sacarina sódica (0,9 %)	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M
	MLX:pH 8,8	MLX	—	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M
	MLX:Tween	MLX	Tween <sup>®</sup> 80 (10 %)	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M
	MLX:Tween:Sacarina	MLX	Tween <sup>®</sup> 80 (10 %) y Sacarina sódica (0,9 %)	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M
	MLX:pH 9,8	MLX	—	Tampón pH 9,8 de glicina
	MLX:pH 9,8:Sacarina	MLX	Sacarina sódica (0,9 %)	Tampón pH 9,8 de glicina 80 %: 20 %
	MLX:pH 9,8:Tween	MLX	Tween <sup>®</sup> 80 (10 %)	Tampón pH 9,8 de glicina 80 %: 20 %
Etapa 2	<i>MLX:AMX:CD</i>	MLX y AMX	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (7,5 %)	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M
	<i>MLX:AMX:Sacarina</i>	MLX y AMX	Sacarina sódica (0,9 %)	Tampón pH 8,8 de glicina 0,033 M

### Proceso de liofilización.

El proceso de liofilización de las muestras se llevó a cabo en un liofilizador Telstar<sup>®</sup> utilizando las siguientes condiciones de trabajo:

- Etapa de congelación, con una duración de 4 horas y a una temperatura del producto final de aproximadamente  $-40^{\circ}\text{C}$ , con una presión de cámara atmosféricas y una temperatura de condensador de  $19^{\circ}\text{C}$ .
- Etapas de desecación primaria, con una duración de 24 horas y a la temperatura de producto de aproximadamente  $-36^{\circ}\text{C}$ , con una presión de cámara de 30 micrones y una temperatura del condensador de  $-50^{\circ}\text{C}$ .

- Etapa de desecación secundaria con una duración de 24 horas y una temperatura de producto final de aproximadamente 30°C, con una presión de cámara de 30 micrones y una temperatura del condensador de -50°C. Las muestras obtenidas después de liofilización se guardaron en un desecador hasta su análisis.

#### **4.3.3. Métodos empleados en la caracterización de las formulaciones: reconstitución, rendimiento y determinación de pH**

La prueba de reconstitución es imprescindible para las formulaciones liofilizadas, se trata de una prueba simple: reconstituir las formulaciones con agua destilada, midiendo el tiempo de solubilización total y observando el aspecto de las disoluciones finales.

Para la prueba de rendimiento, se valora la riqueza de MLX y AMX mediante el método espectrofotométrico a 361 nm para MLX y de primera derivada a 242,6 nm para AMX de acuerdo al método descrito por T. Dao Thanh [7].

Por último se midió el pH de las distintas formulaciones.

#### **4.3.4. Técnicas analíticas para la cuantificación de MLX en los estudios de preformulación y determinación de rendimiento de las formulaciones: espectrofotometría U.V**

Para poder valorar MLX en los estudios de preformulación y valorar ambos principios activos, MLX y AMX, en las formulaciones seleccionadas, se ha puesto a punto un método analítico rápido y sencillo que es la técnica de espectrofotometría ultravioleta (UV) normal y de primera derivada.

La longitud de onda seleccionada para la realización del ensayo espectrofotométrico normal de MLX fue de 361 nm, debido a que en ella el MLX presentaba un máximo de absorción. Cuando la sustancia activa mostraba interferencias con otros componentes de los estudios de solubilidad, es el caso de la lecitina de soja, se empleó un método de espectrofotometría UV de primera derivada, en el cuál se seleccionó la longitud de onda de 335 nm con  $\Delta\lambda = 8$  nm y factor de multiplicación 10.

En el estudio de rendimiento de las formulaciones, se usa la técnica de UV normal a 361 nm para MLX y la técnica de primera derivada a 246,2 nm con  $\Delta\lambda = 8$  nm y factor de multiplicación 10 para AMX.

#### 4.3.5. Métodos empleados en la caracterización químico-física de las materias primas y formulaciones

##### Difracción de rayos X (XRD)

Se ha empleado el método de polvo y barrido de superficie. La muestra se sitúa sobre un portamuestras y se introduce en un equipo Philips XPERT. Cada muestra fue expuesta a una radiación de  $K\alpha$  del cobre ( $\lambda = 1,5418$ ) siendo los ángulos de incidencia desde  $5^\circ$  hasta  $50^\circ$  con un intervalo de  $2\theta$  y con una velocidad de ángulo de  $0,04 (2\theta)$ . Las condiciones del ensayo son de 40 mV de voltaje y 55 mA de intensidad. Los difractogramas obtenidos permiten conocer si las muestras son de naturaleza cristalina o amorfa.

##### Espectroscopía infrarroja con transformada (o en serie) de Fourier (IR)

Se realizó un estudio de los grupos funcionales con el espectro infrarrojos del MLX materia prima, la mezcla física, las formulaciones y sus respectivos excipientes con un equipo Perkin Elmer Spectrum 100. El intervalo del análisis espectroscópico fue de  $4000$  a  $450 \text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se prepararon por compresión con bromuro de potasio.

##### Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El barrido calorimétrico diferencial se realizó en un equipo Mettler 4.000. Todas las muestras se analizaron en cápsulas de aluminio bajo una corriente de nitrógeno.

El ciclo de calentamiento se realizó a una velocidad de calentamiento constante de  $5^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$ , entre  $30$  y  $300^\circ\text{C}$ . En todas las muestras se pesaron  $2 \text{ mg}$ .

##### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica permite evaluar la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras originadas como consecuencia del proceso de liofilización. El estudio de la morfología de las distintas muestras se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido modelo Jeol® JSM 6400. Las muestras se fijan al portamuestras, sometándose a continuación, a un proceso de recubrimiento con una capa de oro de aproximadamente  $15 \text{ nm}$  que permitirá su observación por SEM

#### 4.3.6. Métodos empleados en los ensayos de determinación de inocuidad *in vitro* de las formulaciones

##### Prueba de hemólisis *in vitro*

La prueba de hemólisis *in vitro* se realiza con las dos formulaciones finales.

Los eritrocitos fueron obtenidos de una voluntaria sana de 28 años, tipo 0 positivo con bioquímica de sangre normal mediante un proceso de centrifugación (3000 rpm durante 10 minutos). Posteriormente, los eritrocitos fueron lavados 3 veces con el tampón PBS pH 7,4. Se obtuvo una suspensión de eritrocitos al diluirlos con suero fisiológico. Un volumen de 2 ml de suspensión de eritrocitos fue añadido a 2 ml de muestras de 2 formulaciones y sus blancos (formulaciones sin fármacos). Los tubos de ensayo fueron incubados a 37°C durante 1 hora en un baño de agitación con una velocidad de 50 impulsos/minuto. Se guardaron los tubos de ensayo en la nevera a 4°C durante 5 minutos para detener el proceso de hemólisis. Los sobrenadantes fueron obtenidos después de una centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Las muestras control de 0 % lisis (en suero) y 100 % lisis (en agua destilada) fueron realizadas. La lectura del sobrenadante a 575 nm permite determinar el porcentaje de hemólisis originado por cada formulación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los valores de hemólisis, expresados en porcentaje, se obtendrán utilizando la ecuación según J.F. Krzyzaniak y col. [8]:

$$H(\%) = (Hb - Hbo) / Hbtotal * 100 \quad (4.1)$$

donde:

*Hb*: absorbancia de cada muestra.

*Hbo*: absorbancia basal de hemólisis (control negativo).

*Hbtotal*: absorbancia total de sangre (control positivo).

##### Prueba de precipitación *in vitro*

La prueba de precipitación *in vitro* se realiza con las formulaciones (MLX:AMX:CD y MLX:AMX:Sacarina) con ambos principios activos. Es un método estático de dilución en serie.

Se lleva a cabo de manera siguiente: se añade 1 ml de tampón PBS pH 7,4 a 1 ml de formulación reconstituida y se agita. Se coge 1 ml de la disolución resultante y se le adiciona 1 ml de tampón PBS pH 7,4 y se agita. Este paso se repite hasta obtener

10 diluciones. La disolución final debe tener una concentración 1000 veces menor de la concentración inicial. Después de cada dilución, se realiza una observación visual para conocer la aparición o no de precipitados a cada intervalo de tiempo de 10, 30, 60 minutos.

Después de la observación inicial, las diez diluciones se colocan en un baño de agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, posteriormente se filtran a través de la membrana de  $0,45\ \mu m$ . La concentración de MLX se determina por espectrofotometría UV a 361 nm. La diferencia entre la concentración teórica y la concentración obtenida en cada dilución es la cantidad de fármaco que ha precipitado a partir de 1 ml de la concentración original.

#### 4.3.7. Diseño de estudio de estabilidad de las formulaciones y las técnicas analíticas para la cuantificación de MLX y AMX durante el estudio

##### Diseño de estudio de estabilidad de las formulaciones

Se realizó un estudio de estabilidad comparativa de las dos formulaciones seleccionadas (*MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*). Se estudió la estabilidad tanto física como química de las formulaciones equivalentes a un volumen de 5 ml en su embalaje final, en los viales cerrados con tampón de caucho.

Según ICH [9], se estudió la estabilidad de las dos formulaciones a dos temperaturas distintas y a humedad ambiental, ya que en su embalaje final la humedad residual en los productos no se ve afectada.

Por ello, se utilizaron dos estufas termostatzadas a  $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  y  $40^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  (Radiber S.A., Minidigit II) que corresponden a la condición de  $T^a$  ambiente y acelerada respectivamente.

Se valoró el contenido de dos principios activos MLX y AMX por duplicado de un sólo lote de las dos formulaciones aplicando una técnica validada de HPLC. Las muestras de las formulaciones liofilizadas destinadas a la valoración de principios activos, una vez reconstituidas, fueron convenientemente almacenadas a  $-30^{\circ}C$  hasta su cuantificación por HPLC. Se realizaron por duplicado el estudio de estabilidad física, el tiempo de reconstitución correspondiente a los productos liofilizados, el pH, la determinación de tamaño de partículas y las características organolépticas.

Se realizó la determinación del tiempo de reconstitución de la siguiente manera: se añadieron 5 mL de agua destilada a la formulación y se agitó el envase 3 veces. Se determinó el tiempo que tarda en solubilizarse todo el contenido. El criterio de

aceptación consiste en que la solubilización ocurre instantáneamente.

Se determina el pH de las formulaciones tras la reconstitución. El rango de aceptación de pH final es 7,4- 8,8 con el fin de que no cause molestias durante la inyección.

También se valoran las propiedades organolépticas como el color, olor y apariencia de las disoluciones reconstituidas. La disolución debe ser transparente, estar libre de partículas y de color amarillo por la presencia de MLX. Sin embargo se trata también de la presencia de AMX sódica por lo tanto puede adquirir un color rosado pálido en los primeros minutos de solubilización.

La determinación de tamaño de partículas en las disoluciones reconstituidas se realizó en un equipo Microtrac Zetatrak de espectrofotometría de difracción de luz láser (Dynamic Light Scattering o DLS Particle Size Analyzer). Los límites de medición del equipo oscilan entre 0,8 y 6500 nm. Sus dimensiones se expresan como el diámetro medio en función de la intensidad para disoluciones el criterio de aceptación consiste en que el tamaño medio de partículas no supere 1 nm.

**Tabla 4.2.** Condiciones del estudio de estabilidad

Temperatura	Duración	Frecuencia de Muestreo
25 $\pm$ 2°C	1 año	0, 15, 30, 60, 90, 180, 365 días
45 $\pm$ 2°C	6 meses	0, 15, 30, 60, 90, 180 días

Además, se realizó un estudio de estabilidad en uso con el objetivo de determinar el intervalo de tiempo que podría transcurrir entre la reconstitución de la formulación y su administración, sin que se produjesen fenómenos de degradación de principios activos. Al tratarse de formulaciones parenterales de uso inmediato después de su reconstitución este estudio se realizó durante 24 horas. Se tomaron las muestras al inicio y al final de estudio, y se sometieron a ensayos de estabilidad química (valorar el contenido de los principios activos) y la física: (propiedades organolépticas, determinación de pH y tamaño de partículas).

#### **Técnica analítica de HPLC para la cuantificación de MLX y AMX en el estudio de estabilidad**

Esta técnica de HPLC permite analizar cuantitativamente el MLX y la AMX en las formulaciones durante el estudio de estabilidad. El método utilizado fue validado según ICH [10]. Se emplea un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

(HPLC) Jasco (Tokyo, Japón) modular que consta de: Bomba Jasco PU-1580, detector UV Jasco UV-1575 a 272 nm y un autoinyector Gilson 231 XL (Middleton, WI, U.S.A.). Como fase estacionaria se emplea una columna de fase reversa Col. Mediterranea Sea18 (Barcelona, España) con un diámetro interno de 5  $\mu\text{m}$ , 25 $\times$ 0,5 cm. Las condiciones de la fase móvil son las siguientes:

- Flujo de 1 ml/min.
- Composición: tampón de acetato de sódico 0,17 M pH 6: Acetonitrilo (70:30).
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{l}$ .
- Intervalo de concentración seleccionada: MLX (0,3-15  $\mu\text{g/ml}$ ), AMX sódica (5-50  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Temperatura del ensayo: ambiente, 20°C.
- Tiempo de análisis 20 min. Los tiempos de retención son, aproximadamente, 2-3 min para el pico de la AMX y 13 min para el del MLX.

En el análisis cuantitativo, las muestras son productos liofilizados tomados de las formulaciones seleccionadas para el estudio de estabilidad. Se diluyen convenientemente en agua purificada. Para favorecer la disolución total de los principios activos, estas disoluciones se han sometido a ultrasonidos durante 3 minutos. Se inyectan en el cromatógrafo tras ser filtradas por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). A continuación será preciso comparar los tiempos de retención obtenidos, con los correspondientes de las muestras patrones, de modo que ambos deben coincidir.

#### 4.3.8. Diseño de estudio farmacocinético de las formulaciones y las técnicas analíticas para la cuantificación de MLX y AMX durante el estudio

##### Protocolo del ensayo farmacocinético de las formulaciones seleccionadas

Las formulaciones empleadas para este estudio fueron *MLX:AMX:CD*, *MLX:AMX:Sacarina*. También, se utilizó la disolución de MLX y AMX en suero fisiológico a la concentración de 0,05 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente, como el control de este estudio.

La administración de las formulaciones seleccionadas fue por vía intramuscular en ratones CD-1 de peso aproximadamente 30-35 g. La dosis de AMX administrada por cada ratón es 10 mg/kg, y la dosis administrada de MLX es 0,5 mg/kg.

Tiempo de muestreo: 5, 15, 60, 90, 120 minutos (n=6 por cada punto).

La preparación de las muestras biológicas se realizó de la manera siguiente: se tomaron las muestras plasmáticas heparinizadas y se sometieron a una centrifugación de 5500 r.p.m. durante 20 minutos. El sobrenadante se congeló y se conservó a una temperatura de -20 °C hasta su análisis cromatográfico. En el momento del análisis en la cromatografía, se le añadió 2 volúmenes de metanol por cada volumen de plasma, con el fin de provocar la precipitación de las proteínas plasmáticas y así evitar posibles interferencias en el análisis cromatográfico. Las muestras se sometieron a una centrifugación de 5500 r.p.m. durante 10 minutos y una vez finalizado el proceso se tomó el sobrenadante. Para aumentar la compatibilidad con las fases móviles usadas se le añadió 2 volúmenes de agua destilada por cada volumen del sobrenadante obtenido.

### Tratamiento farmacocinético no compartimental

El estudio de los parámetros farmacocinéticos se realizó mediante un análisis no compartimental. El análisis no compartimental permite a partir de los datos experimentales de concentración/tiempo estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustarlo a un modelo determinado.

Se calcularon los siguientes parámetros:  $C_{max}$ : Concentración máxima  $T_{max}$ : Tiempo en que se alcanza la concentración máxima AUC: Área bajo la curva de niveles plasmáticos MRT: Tiempo medio de residencia  $T_{1/2\beta}$ : Semivida biológica en la fase terminal

Para ello se define el momento de orden cero que corresponde al área bajo la curva (AUC). Esto se puede calcular por el método de los trapezoides a partir de la curva de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo.

$$AUC_0^\infty = AUC_0^t + AUC_t^\infty$$

$$AUC_0^t = \sum_0^t (C_{n-1} + C_n) / 2 * (t_n - t_{n-1})$$

El momento de 1<sup>er</sup> orden, es el tiempo medio de residencia del fármaco en el organismo (MRT), que se define como el tiempo en que este permanece en su forma inalterada en el organismo.

$$MRT = AUCM_0^\infty / AUC_0^t$$



Donde el AUCM es el área bajo la curva del producto de las concentraciones plasmáticas por el tiempo.

El cálculo de la semivida biológica de la fase terminal de la curva de niveles plasmáticos ( $T_{1/2\beta}$ ) se calculó mediante un análisis de regresión lineal de la fase terminal de la curva, obteniéndose así la constante  $\beta$  de disposición de la fase terminal.

$$T_{1/2\beta} = \ln 2 / \beta = 0,693 / \beta$$

Los valores  $C_{max}$  y  $T_{max}$  correspondientes a los valores experimentales equivalen a los datos observados, correspondientes al tiempo de toma de muestra en que el fármaco se encuentra a niveles más elevados.

Para realizar el análisis de bioequivalencia entre las formulaciones y entre las formulaciones y el control se aplica un ANOVA (análisis de la varianza) para los parámetros AUC y  $C_{max}$ . Ya que estos dos últimos son los valores farmacocinéticos más representativos en los estudios de bioequivalencia, según las directrices.

### **Técnicas analíticas de HPLC para la cuantificación de MLX y AMX en las muestras plasmáticas**

Para cuantificar MLX y AMX en las muestras plasmáticas se emplean dos métodos analíticos de cromatografía líquida de alta resolución.

El método de HPLC validado para la cuantificación de ambos principios activos, MLX y AMX, explicado anteriormente, también es validado para la determinación de MLX en las muestras plasmáticas.

El método de HPLC para cuantificar AMX se detalla a continuación.

Se emplea el mismo equipo de HPLC con la misma fase estacionaria, se cambia la fase móvil que es tampón dihidrógeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )– Trietilamina– Acetonitrilo (1000:7:40); el flujo es 1,5 ml/min y la longitud de onda usada es 230 nm.

## **Bibliografía**

- [1] *United States Pharmacopoeia*. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 33 ed., 2010.

- [2] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press, 2006.
- [3] R. G. Strickley, “Solubilizing excipients in oral and injectable formulations.,” *Pharmaceutical research*, vol. 21, pp. 201–30, Feb. 2004.
- [4] N. Seedher and S. Bhatia, “Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems.,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, p. E33, Jan. 2003.
- [5] P. R. Babu, C. V. Subrahmanyam, J. Thimmasetty, R. Manavalan, and K. Valliappan, “Solubility of Meloxicam in Mixed Solvent Systems,” *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, vol. 25, pp. 23–28, Oct. 2007.
- [6] “Synthesis and characterization of binary and ternary complexes of diclofenac with a methyl-beta-CD and monoethanolamine and in vitro transdermal evaluation.,” *European journal of medicinal chemistry*, vol. 45, pp. 4079–88, Sept. 2010.
- [7] T. Dao Thanh, J. Flores-Jaime, C. Álvarez Alvarez, and P. de la Torre-Iglesias, “Spectrophotometric simultaneous determination of meloxicam and sodium amoxicillin in combined dosage forms,” *Journal of Pharmacy Research*, vol. 3, no. 3, pp. 245–248, 2010.
- [8] K. W. Reed and S. H. Yalkowsky, “Lysis of Human Red Blood Cells in the Presence of Various Cosolvents,” *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 39, pp. 64–69, Mar. 1985.
- [9] I. H. T. Guideline, *Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products*. ICH Q1A (R2) (CPMP/ICH/2736/99).
- [10] I. H. T. Guideline, *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. ICH Topic Q2B (CPMP/ICH/281/95).



## Capítulo 5

# Validación de Métodos Analíticos

Según las “Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad de Productos Farmacéuticos”, la validación se debe aplicar no sólo a los procesos de fabricación, sino también a los métodos de análisis y control.

La validación de los métodos analíticos es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de los resultados precisos y exactos, dentro de los atributos de calidad previamente establecidos. Es necesario validar para demostrar que los métodos son adecuados para los análisis propuestos en las condiciones descritas, porque es parte integral del desarrollo de un método analítico, porque es necesario trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, porque resulta mucho más económico trabajar con métodos validados.

Para realizar la validación de los métodos analíticos se han tomado como referencia las directrices de la Conferencia Internacional de Harmonización (ICH) [1]. La validación del método analítico constó de las siguientes partes:

a. Determinación de la especificidad.

El objetivo es demostrar que se alcanza el nivel discriminatorio deseado en los ensayos de:

- Identificación: Consiste en establecer el nivel de discriminación adecuado entre compuestos de estructuras relacionadas que pueda estar presentes. Se verifica mediante la comparación de la muestra con un estándar de referencia, debidamente caracterizado, o por comparación entre muestras que contienen el analito con otras que no lo contienen.
- Impurezas: Consiste en demostrar la capacidad discriminatoria del método

---

para separar el analito en presencia de las impurezas, productos de degradación o excipientes.

b. Determinación de la linealidad

Es la capacidad de un procedimiento de ensayo para dar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un rango del procedimiento analítico definido. Se determina por tratamiento matemático, de los resultados obtenidos en el análisis de muestras con concentraciones crecientes del analito.

c. Determinación de la precisión

Expresa el grado de concordancia o de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea, utilizando el procedimiento de ensayo indicado. Da idea de los errores aleatorios, se puede realizar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad y se expresa como la varianza, desviación estándar y coeficiente de variación de una serie de medidas.

- Repetibilidad. Expresa la precisión del procedimiento de ensayo cuando es realizado por el mismo analista en cortos intervalos de tiempo, bajo condiciones iguales en cuanto a equipos, reactivos, condiciones experimentales y condiciones ambientales. Mide variaciones intra- ensayos.
- Precisión intermedia. Se refiere a las variaciones de un laboratorio, cuando el procedimiento se realiza en distintos días, analistas, equipo...
- Reproducibilidad. Expresa la precisión entre laboratorios, y se establece para los estudios de colaboración. En nuestro caso, no se ha realizado debido a que todos los ensayos realizados en el mismo laboratorio.

d. Determinación de la exactitud.

Expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero y el obtenido con el procedimiento de ensayo. Da una indicación de los errores sistemáticos, y se expresa como porcentaje de recuperación o como diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza. Se puede calcular a partir de 9 determinaciones sobre, al menos, 3 niveles de concentración.

e. Sensibilidad.

La sensibilidad de un método analítico se expresa en el límite de detección y límite de cuantificación. El límite de detección es la cantidad mas baja de un analito que puede ser detectada pero no cuantificada como un valor exacto. Mientras el límite de cuantificación se define como la concentración más baja que puede determinarse cuantitativamente como aceptable precisión y exactitud.

En este capítulo se realizará la validación de los siguientes métodos analíticos:

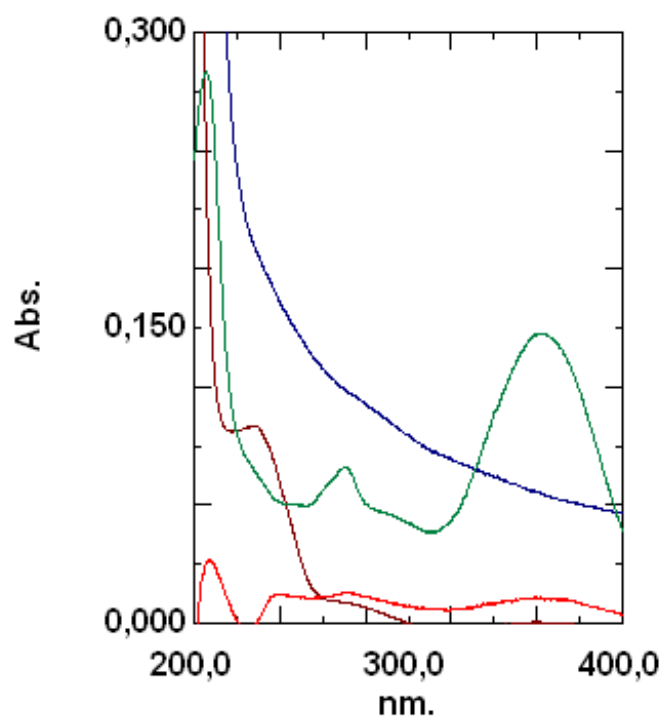
- Análisis de MLX por espectrofotometría directa.
- Análisis de MLX por espectrofotometría de primera derivada.
- Análisis de AMX por espectrofotometría de primera derivada.
- Análisis de MLX, AMX y sus productos de degradación por HPLC.
- Análisis de MLX y AMX en muestras plasmáticas por HPLC.

## **5.1. Análisis de MLX por espectrofotometría directa U.V**

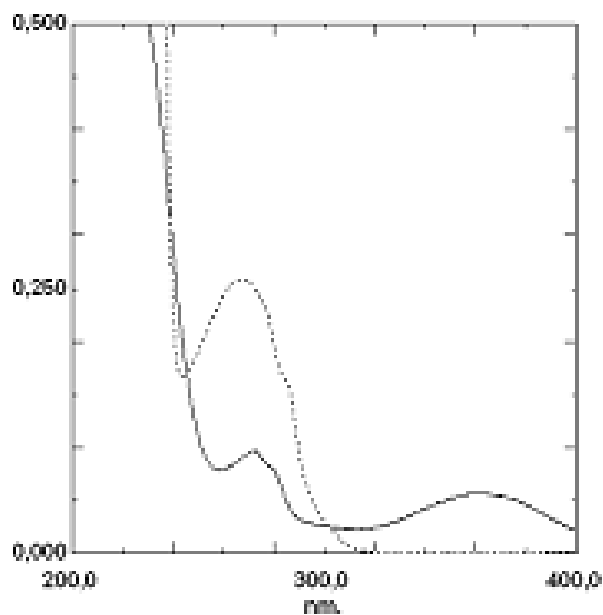
Este método analítico será empleado para la cuantificación de MLX, en los siguientes ensayos: determinación del coeficiente de solubilidad de este principio activo en los diferentes medios y con la presencia de los excipientes y también en la determinación de rendimiento del mismo en las formulaciones estudiadas.

### **5.1.1. Selectividad**

La especificidad es la capacidad de detectar al analito sin interferencias de otros compuestos por ejemplo los excipientes usados. Por ello, se estudiaron el espectro de los excipientes y el placebo de las formulaciones seleccionadas teniendo en cuenta la dilución necesaria con el tampón PBS a la hora de hacer las lecturas. De esta forma, se obtuvieron los espectros de las Fig. 5.1 y 5.2.



**Figura 5.1.** Espectro normal de MLX 3,75 µg/ml (—), Tween<sup>®</sup> 80 a la dilución 1:50 realizada con tampón PBS (—), Span<sup>®</sup> 85 a la dilución 1:50 realizada con tampón PBS (—) y lecitina de soja a la dilución 1:50 realizada con tampón PBS (—).



**Figura 5.2.** Espectros normales de mezcla de MLX 1 µg/ml y AMX 20 µg/ml (—) y de placebo de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* (---)

La longitud de onda seleccionada para la realización del ensayo espectrofotométrico normal de MLX fue de 361 nm, debido a que en ella el fármaco presentaba un máximo de absorción. Como se observa, la interferencia de los componentes es mínima a excepción de la lecitina de soja. De esta forma, se puede afirmar que el método espectrofotométrico propuesto es específico para la determinación de MLX a 361nm con la presencia de los excipientes con la excepción de lecitina de soja, como consecuencia se va a proponer un método de primera derivada para este caso.

### 5.1.2. Linealidad

Se estudia la capacidad de este método para obtener resultados proporcionales a las concentraciones del analito dentro de un intervalo determinado. Su determinación se realiza para cinco concentraciones distintas a partir de una solución madre. Sus resultados se muestran en la Fig. 8 obteniéndose la siguiente recta de regresión:

$$\text{Absorbancia} = A + B \times C$$

$$\text{Absorbancia} = 0,0000344 + 0,0514 \times C$$

$$r = 0,9999, \quad r^2 = 0,9998$$

**Tabla 5.1.** Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal  $y=a+bx$

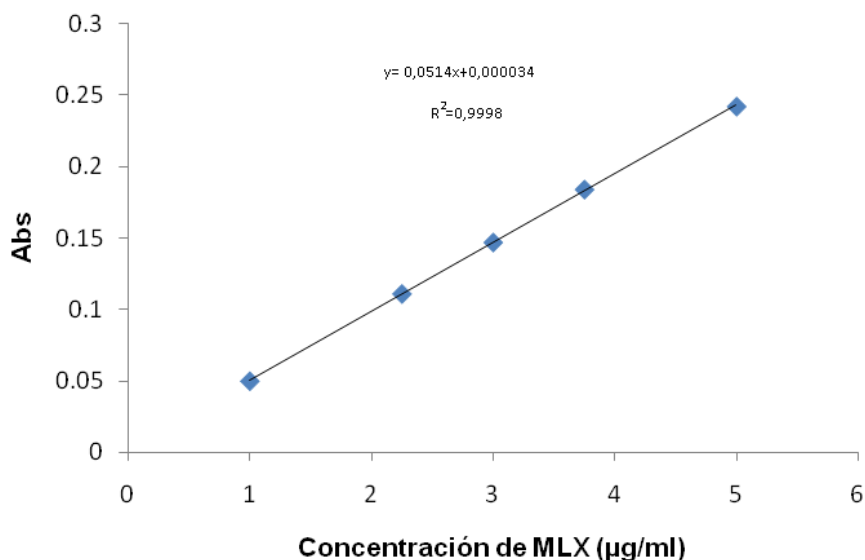
Parámetro de origen	Valor	V.A	Parámetro de origen	Valor	V.A
Valor a	0,000034		Valor b	0,0514	
Desviación estándar	0,00066		Desviación estándar	0,0002	
Desviación estándar relativo	194,1 %		Desviación estándar relativo	0,389 %	<2 %
Intervalo de confianza*	(-0,00139;0,00146)	Incluye el 0	Intervalo de confianza*	(0,051; 0,518)	
T estadístico**	1,64	<2,145	T estadístico**	155,44	>2,145

V.A= Valor aceptada.

\* Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95 %.

\*\* Valor de T student para un nivel de significación  $P=0,05$  con el grado de libertad  $n-1=14$ .





**Figura 5.3.** Recta de calibrado de MLX en tampón PBS.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el método es lineal dentro del intervalo de concentración utilizado, ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados, además es un método proporcional, puesto que la recta de calibración pasa por origen de coordenadas.

### 5.1.3. Precisión

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

#### Repetibilidad

Según lo exigido por la ICH [1], se realizaron tres mediciones en las tres concentraciones preparadas: una concentración de 3 µg/ml que contiene un 100 % de analito, 2,25 µg/ml para la muestra que contiene un 75 % y 3,75 µg/ml para la muestra que representa un 125 %. Se calculó el coeficiente de variación. Los resultados quedan reflejados en la tabla 5.2

**Tabla 5.2.** Precisión del método mediante estudios de repetibilidad para muestras a las que se les adiciona un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	75 %	100 %	125 %
1	0,115	0,154	0,192
	0,118	0,154	0,191
	0,115	0,152	0,191
2	0,119	0,160	0,203
	0,119	0,158	0,198
	0,120	0,158	0,199
3	0,114	0,152	0,191
	0,113	0,152	0,195
	0,115	0,151	0,190
$\bar{x} \pm SD$	0,1165±0,0025	0,1549±0,0033	0,1945±0,0046
C.V	2,16 %	2,11 %	2,35 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 2,35 % lo que permite considerar que este método presenta una buena repetibilidad en el análisis de MLX.

### Precisión intermedia

Para estudiarla, se determinó en cada concentración el coeficiente de variación, a partir de nueve datos: los tres obtenidos el primer día, los tres del segundo día y los tres del tercer día. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 5.3.** Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX

DÍAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	75 %	100 %	125 %
1	0,109	0,150	0,183
	0,109	0,148	0,185
	0,111	0,149	0,184
2	0,115	0,154	0,192
	0,115	0,152	0,191
	0,118	0,154	0,191
3	0,116	0,157	0,196
	0,118	0,158	0,195
	0,119	0,156	0,195
$\bar{x} \pm SD$	0,1144±0,0033	0,1531±0,0036	0,1902±0,0050
C.V	3,39 %	2,34 %	2,64 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 3,39 % lo que permite considerar que este método presenta una buena precisión intermedia en el análisis de MLX.

Al presentar en los casos de repetibilidad y precisión un C.V. menor del 5 % se puede considerar este método como preciso.

#### 5.1.4. Recuperación

Muestra la capacidad del método analítico para dar los resultados más próximos al valor real. Al tampón PBS se le añadieron cantidades conocidas de MLX materia prima y se agitó hasta su completa disolución. El analito se añadió en tres magnitudes de cantidad distintas, siempre por triplicado. Posteriormente se cuantificaron las soluciones formadas siguiendo el método analítico. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Resultados de recuperación de MLX en las muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), 100 % (3 µg/ml); 125 % (3,75 µg/ml) de MLX.

% de MLX adicionado a la muestra	% de MLX recuperado	% recuperado
Muestra + 75 % MLX	75,10	100,13
	74,93	99,92
	75,73	100,98
Muestra+100 % MLX	100,50	100,50
	99,79	99,79
	100,14	100,14
Muestra+125 % MLX	125,69	100,56
	125,85	100,68
	126,03	100,83
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		100,39 $\pm$ 0,414
C.V		0,41 %

La recuperación de esta técnica presenta valores de C.V. del 0,41 %. No hay retenciones ni pérdidas del analito.

#### 5.1.5. Sensibilidad

La sensibilidad se demuestra en los límites de detección y de cuantificación. La Conferencia Internacional de Harmonización [1] ofrece tres posibilidades para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación: una primera visual, una segunda basada en la relación entre señal y ruido y una tercera posibilidad que es la aplicación de un método matemático. De todos ellos se optó por el método más fiable que es el método basando en la relación entre señal y ruido. Los resultados son 0,15 µg/ml, límite de detección de meloxicam y 0,40 µg/ml, límite de cuantificación.

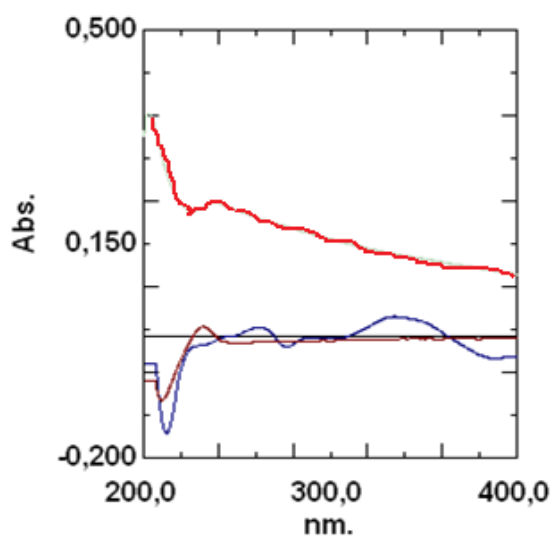
### 5.2. Análisis de MLX por espectrofotometría de primera derivada

Para analizar cuantitativamente el meloxicam en los estudios dónde hay interferencia en el espectro normal (por ejemplo la lecitina de soja que absorbe también a la longitud de onda de 361 nm), se ha realizado una validación de la técnica de primera derivada de la espectrofotometría de absorción en el espectro ultravioleta /

visible. Esta técnica ha demostrado su capacidad de determinar cuantitativamente las sustancias en mezclas de multicomponentes [2, 3, 4]. La espectrofotometría derivada se basa en los resultados obtenidos a partir de la derivada del espectro de orden cero de la absorción UV-Vis. El espectro derivado contiene los perfiles más característicos en comparación del normal: aparecen nuevos picos máximos y mínimos y los puntos que cruzan el eje X. Por otro lado, la espectrofotometría derivada mantiene todas las reglas de espectrofotometría normal, por ejemplo, la dependencia de los valores derivados en la concentración de los analitos y la regla de aditividad. Las características mencionadas anteriormente permiten la determinación de varios componentes en una mezcla mediante la medición de la amplitud de espectro derivado de la mezcla. Si la medición de la altura de los picos de un analito se realiza a las longitudes de onda a las cuales los espectros de los otros componentes de la mezcla cruzan el eje X, la amplitud es proporcional únicamente a la concentración del componente en cuestión [5].

### 5.2.1. Selectividad

Se estudia la selectividad del MLX con los excipientes usados, especialmente analizando la selectividad respecto a la lecitina de soja, porque se ha demostrado una interferencia significativa en el espectro normal. Por lo tanto en la selectividad de primera derivada se comparan los barridos de soluciones de principio activo con el barrido de primera derivada de una muestra de lecitina de soja a la dilución de 1:625 en el tampón PBS. Esta dilución corresponde a la dilución que se utiliza para determinar la concentración de MLX en las pruebas de solubilidad (Fig 5.4) donde se observa la ausencia de interferencias para la longitud de onda de 335 nm que se corresponden con el pico máximo de la primera derivada de MLX. Las condiciones de trabajo son  $\Delta\lambda = 8$  nm y factor de multiplicación 10.



**Figura 5.4.** Barridos de primera derivada de meloxicam (—), de lecitina de soja (—) y barrido de espectro normal de lecitina de soja (—)

### 5.2.2. Linealidad

Se determinó la linealidad del método a partir de cinco niveles de concentración en el intervalo de 1-5  $\mu\text{g/ml}$ . Se obtuvo la recta de calibrado siguiente:

$$\text{Absorbancia} = A + B \times C$$

$$\text{Absorbancia} = -0,00013 + 0,01096 \times C$$

$$r = 0,9998, \quad r^2 = 0,9996$$

**Tabla 5.5.** Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal  $y=a+bx$

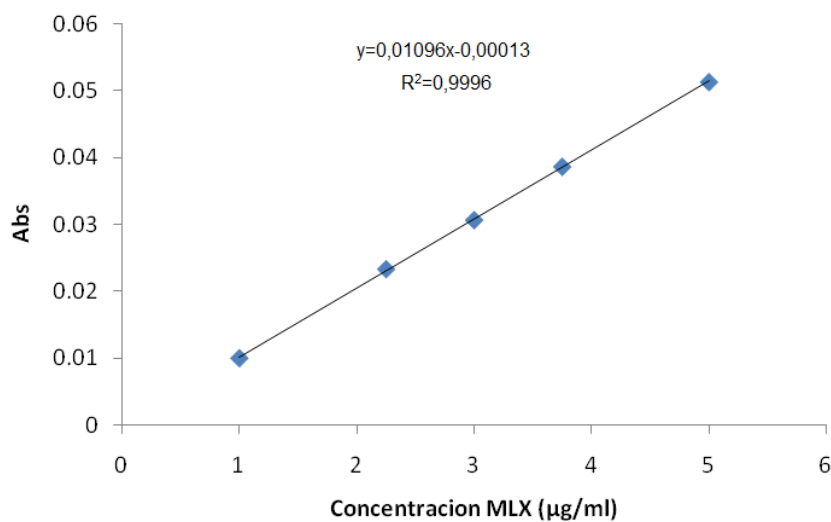
Parámetro de origen	Valor	V.A	Parámetro de origen	Valor	V.A
Valor a	-0,00013		Valor b	0,01096	
Desviación estándar	0,000197		Desviación estándar	0,0000598	
Desviación estándar relativo	151,54 %		Desviación estándar relativo	0,0000598 %	<2 %
Intervalo de confianza*	(-0,00056;0,0003)	Incluye el 0	Intervalo de confianza*	(0,01083; 0,01109)	
T estadístico**	-0,66	<2,145	T estadístico**	141,54	>2,145

donde:

V.A= Valor aceptada.

\* Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95 %.

\*\* Valor de T student para un nivel de significación  $P=0,05$  con el grado de libertad  $n-1=14$ .



**Figura 5.5.** Recta de calibrado de MLX en el espectro de primera derivada a 335 nm

Como conclusión, la linealidad de  $Y=0,011X-0,00013$  se consigue con la primera derivada de MLX en espectrofotometría UV a la longitud de onda de 335 nm en el intervalo de concentración de 1-5 µg/ml bajo las condiciones de trabajo:  $\Delta\lambda = 8$  nm y factor de multiplicación 10.

### 5.2.3. Precisión

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

#### Repetibilidad

La repetibilidad del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración de 3 µg/ml que contiene un 100 % de analito, 2,25 µ g/ml para la muestra que contiene un 75 % y 3,75 µg/ml para la muestra que representa un 125 %. Los resultados de altura de los picos y sus C.V. se representan en la tabla 5.6.

**Tabla 5.6.** Precisión del método mediante estudios de repetibilidad para muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	75 %	100 %	125 %
1	0,025	0,033	0,041
	0,025	0,033	0,040
	0,025	0,032	0,041
2	0,025	0,034	0,043
	0,025	0,034	0,042
	0,026	0,034	0,042
3	0,025	0,034	0,042
	0,026	0,034	0,042
	0,026	0,034	0,042
$\bar{x} \pm SD$	0,0253±0,0005	0,0334±0,0007	0,0415±0,0008
C.V	1,81 %	2,13 %	2,00 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 2,0 %, lo que permite considerar que este método presenta una muy buena repetibilidad en el análisis de MLX.

### Precisión intermedia

Este ensayo se realizó midiendo tres muestras diferentes, que se corresponden con los porcentajes del 75, 100 y 125, durante 3 días diferentes, sus resultados se muestran en la tabla 5.7.



**Tabla 5.7.** Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), un 100 % (3 µg/ml) y un 125 % (3,75 µg/ml) de MLX.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	75 %	100 %	125 %
1	0,023	0,030	0,038
	0,023	0,031	0,039
	0,024	0,031	0,038
2	0,025	0,033	0,041
	0,025	0,033	0,040
	0,025	0,032	0,041
3	0,025	0,034	0,042
	0,025	0,034	0,042
	0,025	0,033	0,041
$\bar{x} \pm SD$	0,0244±0,0009	0,0323±0,0014	0,0402±0,0016
C.V	3,61 %	4,37 %	3,89 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 4,37 % lo que permite considerar que este método presenta una buena precisión intermedia en el análisis de MLX.

Al presentar en los casos de repetibilidad y precisión un C.V. menor del 5 % podemos considerar este método como preciso.

#### 5.2.4. Recuperación

La recuperación se calculará mediante el coeficiente de variación (C.V.), para una muestra placebo a los que se ha adicionado tres concentraciones diferentes de MLX. La muestra placebo para este estudio consistía en una mezcla de lecitina de soja en el tampón PBS a 2,3 %. Sus resultados se muestran en la tabla 5.8.

**Tabla 5.8.** Resultados del estudio de recuperación de MLX en presencia de una muestra placebo de lecitina de soja en tampón PBS a 2,3 % para muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), 100 % (3 µg/ml); 125 % (3,75 µg/ml) de MLX.

% de MLX adicionado a la muestra	% de MLX recuperado	% recuperado
Muestra + 75 % MLX	76,18	101,57
	74,88	99,84
	75,49	100,65
Muestra+100 % MLX	99,62	99,62
	100,44	100,44
	100,09	100,09
Muestra+125 % MLX	124,04	99,27
	125,02	100,02
	123,47	98,77
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		100,03 $\pm$ 0,81
C.V		0,81 %

La recuperación de esta técnica presenta valores de C.V. del 0,81 %. No hay retenciones ni pérdidas del analito.

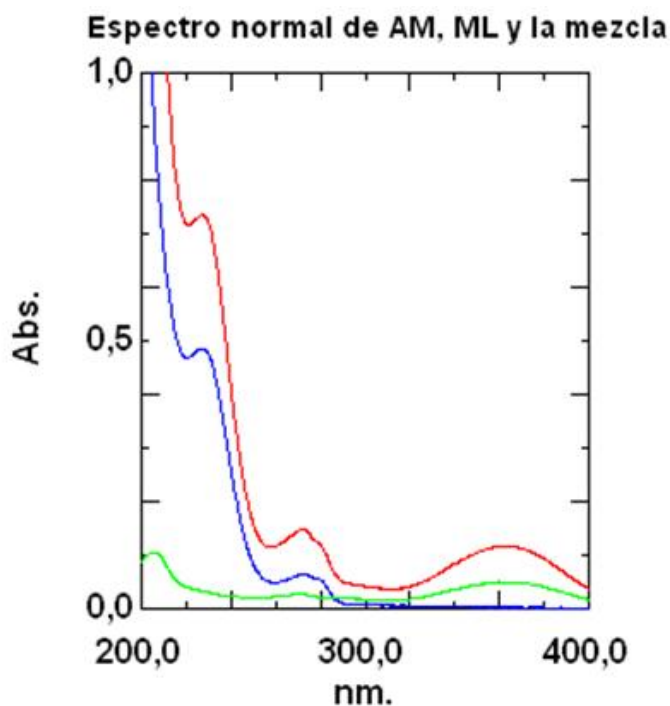
#### 5.2.5. Sensibilidad

Los límites de detección y de cuantificación del método, calculados por la relación entre señal y ruido son 0,15 µg/ml y 0,8 µg/ml respectivamente.

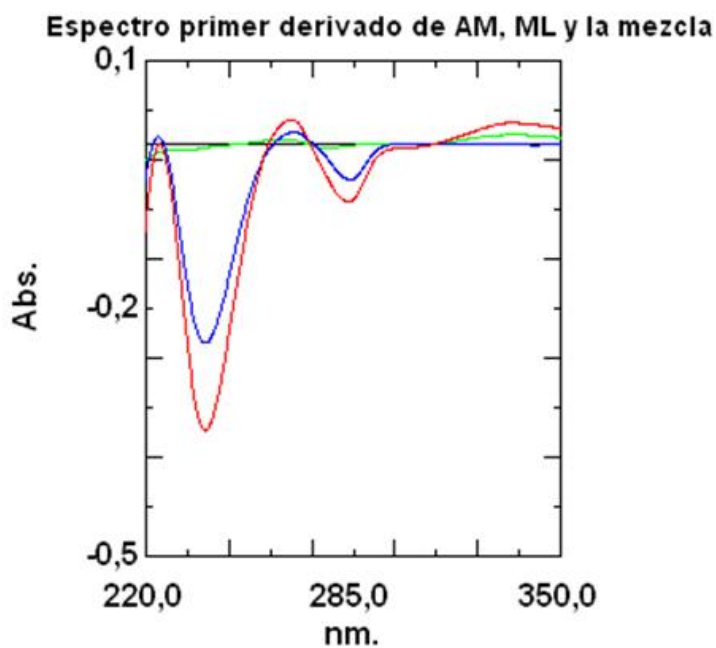
### 5.3. Análisis de AMX por Espectrofotometría de primera derivada

Los espectros de absorción de MLX y AMX están superpuestos en el intervalo de longitud de onda de 200-300 nm (ver Figura 5.6). Por lo tanto la valoración de MLX es posible mediante el método UV de espectro normal validado según el apartado anterior, sin embargo la determinación de AMX resulta imposible por las interferencias de MLX. Se ha llevado a cabo la determinación de AMX mediante espectrofotometría UV de primera derivada ya que esta técnica ha demostrado su eficacia en la determinación simultánea de varios analitos en sistemas multicomponentes (Anexo 1). Es un método sencillo y rápido para determinar el rendimiento

de AMX en las formulaciones preparadas.



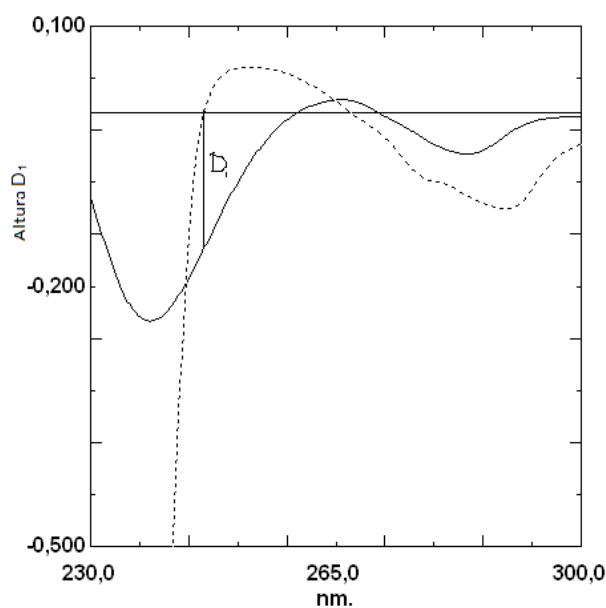
**Figura 5.6.** Espectro normal de MLX 1 µg/ml (—), de AMX 20 µg/ml (—), de mezcla de MLX 2 µg/ml y AMX 40 µg/ml (—) a las cuales concentraciones proporcionales a las concentraciones de las formulaciones.



**Figura 5.7.** Espectro de primera derivada de MLX 1 µg/ml (—), de AMX 20 µg/ml (—), de mezcla de MLX 2 µg/ml y AMX 40 µg/ml (—).

### 5.3.1. Selectividad

Se estudió la selectividad del método en cuestión frente al placebo de las formulaciones seleccionadas. Se ha observado que los excipientes no interfieren a la altura de absorción del espectro de primera derivada de AMX  $D_1$  a 246,2 nm (ver Fig. 5.8). Por lo tanto, se ha validado un método espectrofotométrico UV de primera derivada para la determinación de AMX a la longitud de onda de 246,2 nm.



**Figura 5.8.** Espectros de primera derivada de la mezcla de MLX 1 µg/ml y AMX 20 µg/ml (—) a las concentraciones proporcionales a las de las formulaciones y del placebo de la formulación AMX:MLX:sacarina (---).

### 5.3.2. Linealidad

Su determinación se realiza para cinco concentraciones distintas a partir de una solución madre de AMX. Sus resultados se muestran a continuación.

$$\text{Absorbancia} = A + B \times C$$

$$\text{Absorbancia} = 0,002 - 0,0075 \times C$$

$$r = 0,9998, \quad r^2 = 0,9997$$

### 5.3. ANÁLISIS DE AMX POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE PRIMERA DERIVADA

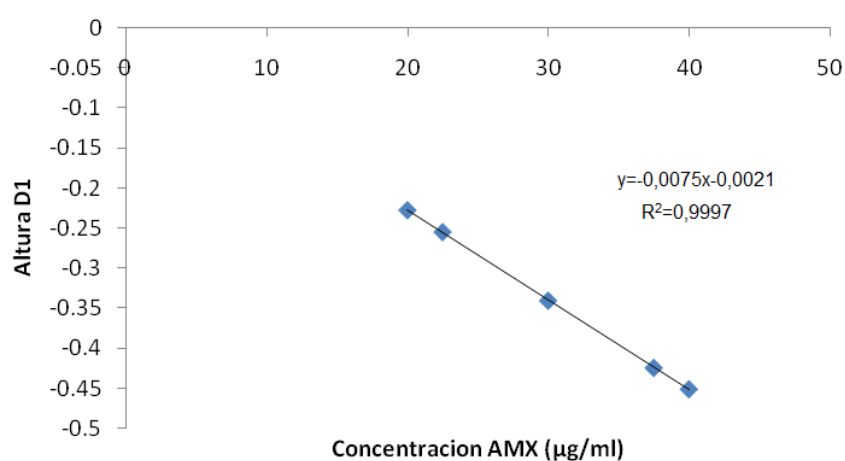
**Tabla 5.9.** Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal  $y=a+bx$

Parámetro de origen	Valor	V.A	Parámetro de origen	Valor	V.A
Valor a	-0,0021		Valor b	-0,0075	
Desviación estándar	0,000079		Desviación estándar	0,00244	
Desviación estándar relativo	151,54 %		Desviación estándar relativo	0,637 %	<2 %
Intervalo de confianza*	(-0,0073;0,00317)	Incluye el 0	Intervalo de confianza*	(-0,0077;- 0,00743)	
T estadístico**	-2,04	<2,145	T estadístico**	-238,02	<-2,145

V.A= Valor aceptada.

\* Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95 %.

\*\* Valor de T student para un nivel de significación  $P=0,05$  con el grado de libertad  $n-1=14$ .



**Figura 5.9.** Recta de calibración de AMX en tampón PBS.

En conclusión, la determinación de AMX se realiza por la recta de calibrado:  $y = -0,0075x - 0,0021$  en espectrofotometría UV de primera derivada a la longitud

de onda de 246,2nm utilizando  $\Delta\lambda = 8$  nm y factor de multiplicación 10, siendo lineal en el intervalo de concentración de 20 a 40  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.3.3. Precisión

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

#### Repetibilidad

La repetibilidad del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$  que contiene un 100 % de analito, 22,5  $\mu\text{g/ml}$  para la muestra que contiene un 75 % y 37,5  $\mu\text{g/ml}$  para la muestra que representa un 125 %. Los valores obtenidos en unidades de absorbancia y sus C.V. se representan en la tabla 5.10.

**Tabla 5.10.** Precisión del método mediante estudios de repetibilidad para muestras que contienen un 75 % (30  $\mu\text{g/ml}$ ), un 100 % (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y un 125 % (50  $\mu\text{g/ml}$ ) de MLX.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	75 %	100 %	125 %
1	-0,171	-0,229	-0,285
	-0,168	-0,228	-0,283
	-0,168	-0,229	-0,282
2	-0,173	-0,227	-0,283
	-0,168	-0,227	-0,279
	-0,167	-0,227	-0,278
3	-0,171	-0,227	-0,284
	-0,170	-0,228	-0,285
	-0,171	-0,224	-0,286
$\bar{x} \pm SD$	-0,1697 $\pm$ 0,0020	-0,2278 $\pm$ 0,0009	-0,2828 $\pm$ 0,0027
C.V	1,18 %	0,39 %	0,96 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 1,18 %, lo que permite considerar que este método presenta una buena repetibilidad en el análisis de la amoxicilina sódica.

### Precisión intermedia

Este ensayo se realizó midiendo tres muestras diferentes, que se corresponden con los porcentajes del 75, 100 y 125, durante 3 días diferentes, sus resultados se muestran en la tabla 5.11.

**Tabla 5.11.** Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX

DÍAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	75 %	100 %	125 %
1	-0,172	-0,229	-0,287
	-0,170	-0,229	-0,286
	-0,171	-0,228	-0,285
2	-0,170	-0,227	-0,285
	-0,171	-0,225	-0,286
	-0,167	-0,226	-0,285
3	-0,171	-0,228	-0,283
	-0,168	-0,229	-0,285
	-0,168	-0,229	-0,282
$\bar{x} \pm SD$	-0,170±0,02	-0,228±0,001	-0,285±0,02
C.V	1,01 %	0,65 %	0,54 %

Los valores de C.V. son, en este caso, como máximo del 1,01 % lo que permite considerar que este método presenta una buena precisión intermedia en el análisis de AMX.

Al presentar en los casos de repetibilidad y precisión intermedia un C.V. menor del 5 % se puede considerar este método como preciso.

#### 5.3.4. Recuperación

La recuperación se calculará mediante el coeficiente de variación (C.V.), para una muestra placebo de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* a la que se ha adicionado tres concentraciones diferentes de AMX. Sus resultados se muestran en la tabla 5.12.

**Tabla 5.12.** Resultados de recuperación de MLX en las muestras que contienen un 75 % (2,25 µg/ml), 100 % (3 µg/ml); 125 % (3,75 µg/ml) de MLX.

% de MLX adicionado a la muestra	% de MLX recuperado	% recuperado
Muestra + 75 % MLX	75,10	100,13
	74,93	99,92
	75,73	100,98
Muestra+100 % MLX	100,50	100,50
	99,79	99,79
	100,14	100,14
Muestra+125 % MLX	125,69	100,56
	125,85	100,68
	126,03	100,83
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		100,39 $\pm$ 0,414
C.V		0,41 %

La recuperación de esta técnica presenta valores de C.V. del 0,41 %. No hay retenciones ni pérdidas del analito.

### 5.3.5. Sensibilidad

Los límites de detección y de cuantificación del método calculados por la relación entre señal y ruido son 0,8 µg/ml y 1,5 µg/ml respectivamente.

## 5.4. Análisis simultáneo de AMX y MLX por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación de AMX y MLX por HPLC en las muestras del estudio de estabilidad química, se ha desarrollado un nuevo método validado según ICH [1]. La principal dificultad para analizar ambos fármacos simultáneamente es que poseen diferentes características de polaridad. El MLX tiene un tiempo de retención adecuado sólo en el caso del uso de una gran cantidad de disolvente orgánico en la fase móvil, mientras que la AMX al ser más polar presenta unos tiempos de retención muy bajos en las mismas condiciones.

Se emplea un cromatógrafo de líquido de alta resolución (HPLC) Jasco (Tokyo, Japón) modular que consta de: Bomba Jasco PU-1580, detector UV Jasco UV-1575



a 272 nm y un autoinyector Gilson 231XL (Middleton, WI, U.S.A).

Como fase estacionaria se emplea una columna de fase reversa Mediterranea Sea18 (Barcelona, España) con un diámetro interno de 5  $\mu\text{m}$ , y dimensiones 25 $\times$ 0,5 cm.

Las condiciones de la fase móvil son las siguientes:

- Flujo de 1 ml/min.
- Composición: tampón de acetato sódico 0,17 M de pH 6: Acetonitrilo (70:30).
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{l}$ .
- Intervalo de concentración seleccionada: AMX (5-50  $\mu\text{g/ml}$ ), MLX (0,3-15  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Temperatura del ensayo: ambiente.
- Tiempo de análisis 20 min. Los tiempos de retención son, aproximadamente, 2-3 min para el pico de AMX y 13 min para MLX.

La preparación de las disoluciones a inyectar se describe a continuación:

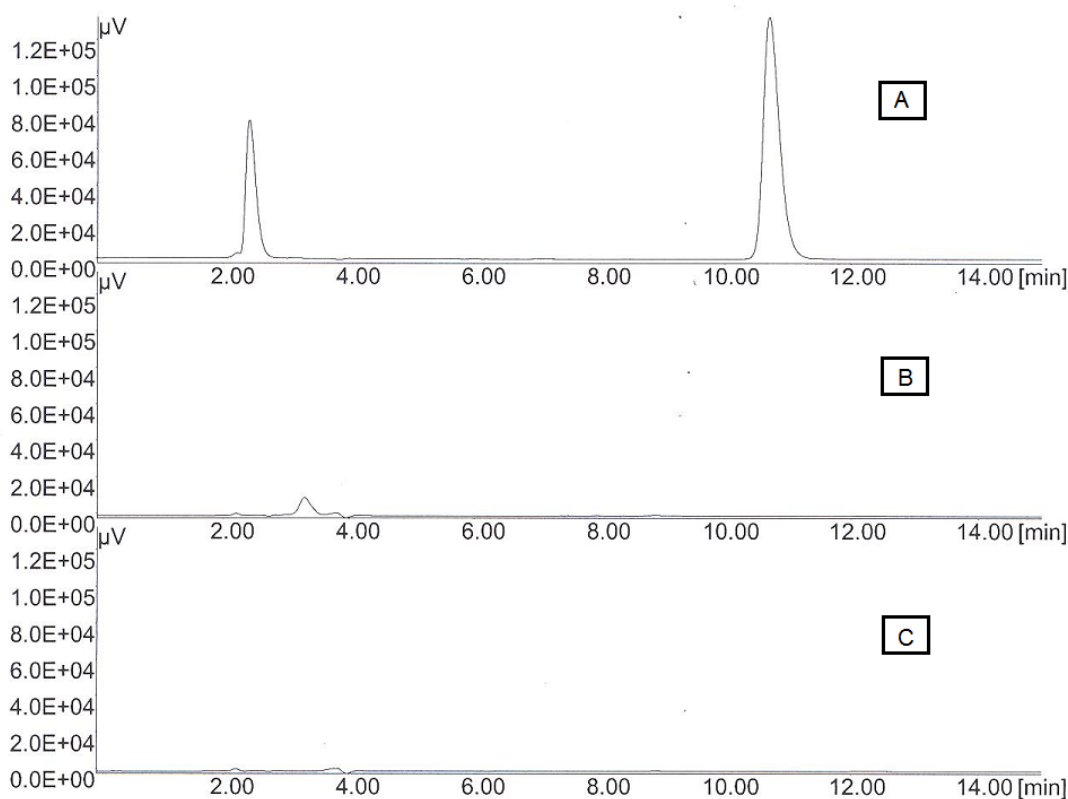
- Disoluciones patrón: se emplean para la validación del método y se utilizan diariamente para la valoración de las muestras problema. Corresponden a soluciones realizadas con fase móvil de AMX a la concentración de 1 mg/ml y disoluciones con acetonitrilo de MLX a la misma concentración. Se desechan una vez transcurridas 8 horas desde su preparación.
- Disoluciones de muestras problema: se trata de las muestras sólidas, se disuelven y diluyen convenientemente en agua purificada. Para favorecer la disolución total de los principios activos, estas disoluciones se sometieron al ultrasonidos durante 3 minutos. Las muestras se inyectan antes de que transcurran los 30 minutos desde su preparación, previa filtración por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La validación del método se precisan a continuación.

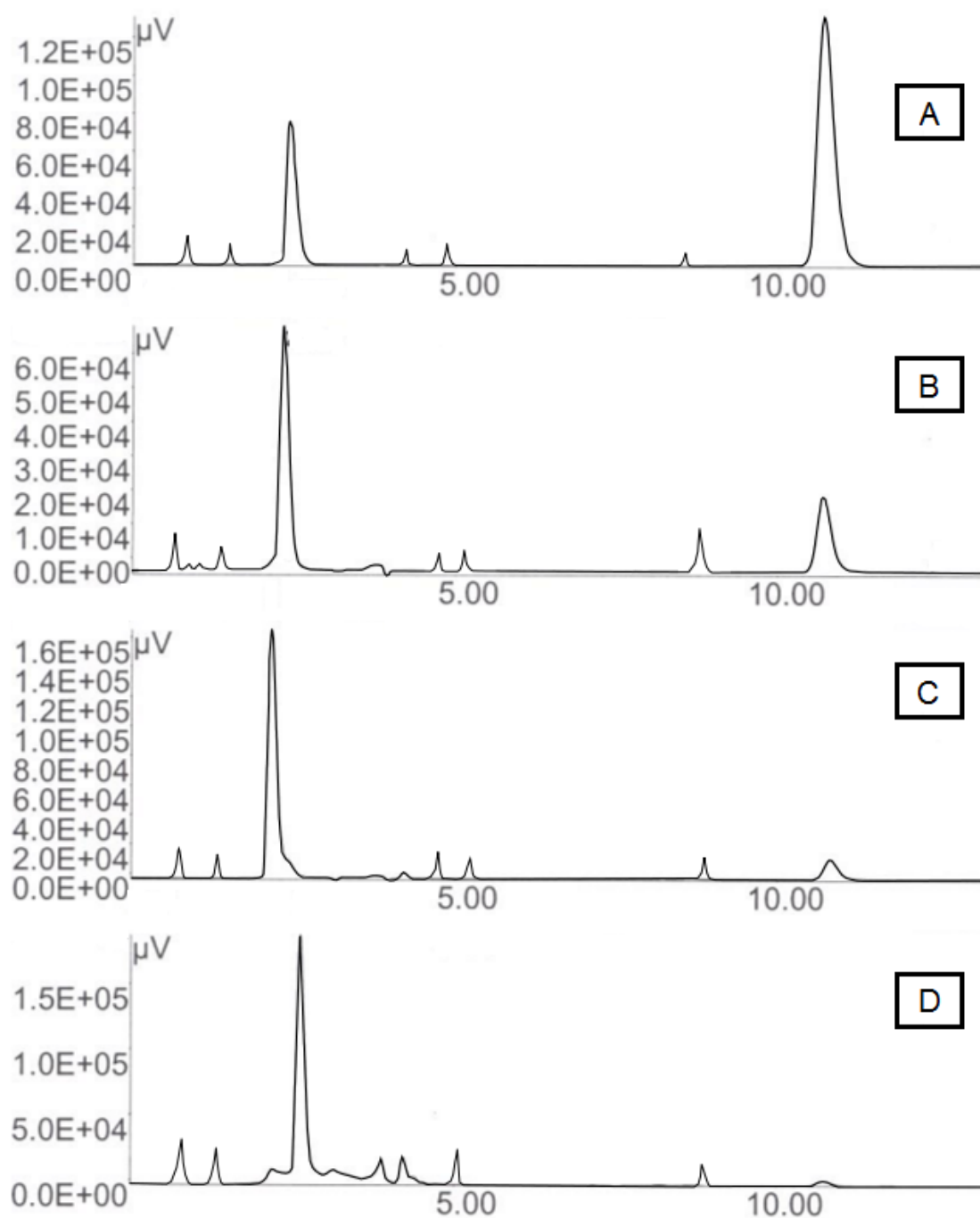
#### 5.4.1. Selectividad

Primero, el método demuestra su capacidad de separar dos principios activos en cuestión ya que el tiempo de retención de AMX es aproximadamente 2 minutos y el de MLX es 11 minutos (ver Figura 5.10).

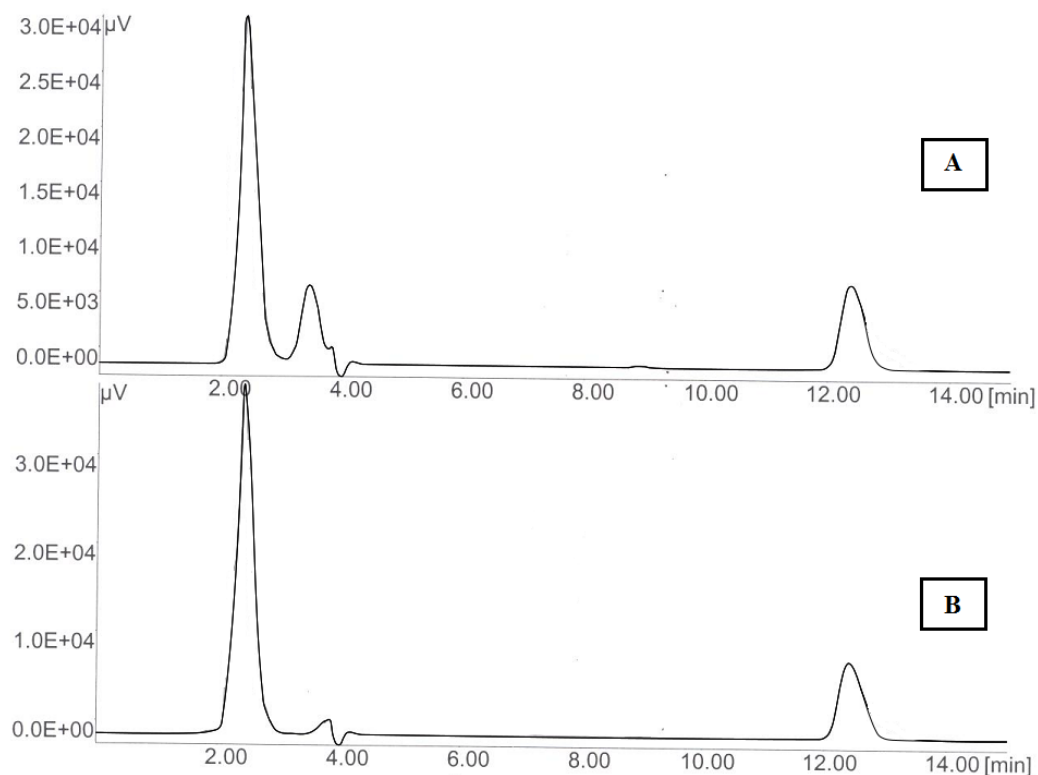
Además, se estudió la selectividad del método frente los excipientes presentes en las formulaciones desarrolladas. Asimismo, como se trata de un método empleado para estudiar la estabilidad de los productos terminados, se demostró su selectividad frente los posibles productos de degradación de los principios activos. Para obtener los productos de degradación, se sometieron ambos fármacos a las siguientes condiciones extremas: condición ácida (HCl, 3N), condición básica (NaOH, 3N), y condición oxidativa ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3 %) y condición térmica (temperatura de 80 °C) 24 horas antes de su análisis (ver Figura 5.11).



**Figura 5.10.** Cromatogramas de: **A)** la mezcla de MLX a concentración de 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y AMX a concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , **B)** blanco de la formulación *MLX:AMX:Sacarina*, **C)** blanco de formulación *MLX:AMX:CD* respectivamente.



**Figura 5.11.** Cromatogramas de la mezcla de MLX y AMX a concentración inicial de 2  $\mu g/ml$  y 40  $\mu g/ml$ , respectivamente y sus productos de degradación: **A)** degradación con calor, **B)** en medio ácido, **C)** en medio básico, **D)** en agua oxidada.



**Figura 5.12.** Cromatogramas: **A)** de la formulación *MLX:AMX:Sacarina*, **B)** de la formulación *MLX:AMX:CD*, recientemente preparadas.

#### 5.4.2. Linealidad

Se estudia la capacidad del método para obtener los resultados proporcionales a las concentraciones de ambos analitos dentro de un intervalo determinado. Su determinación se realiza con cinco concentraciones distintas a partir de la misma solución madre. Los resultados se muestran a continuación.

##### 1. AMX

$$\hat{\text{Área}} = A + B \times C$$

$$\hat{\text{Área}} = -8612,6 + 15797 \times C$$

$$r = 0,9999, \quad r^2 = 0,9998$$

#### 5.4. ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE AMX Y MLX POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

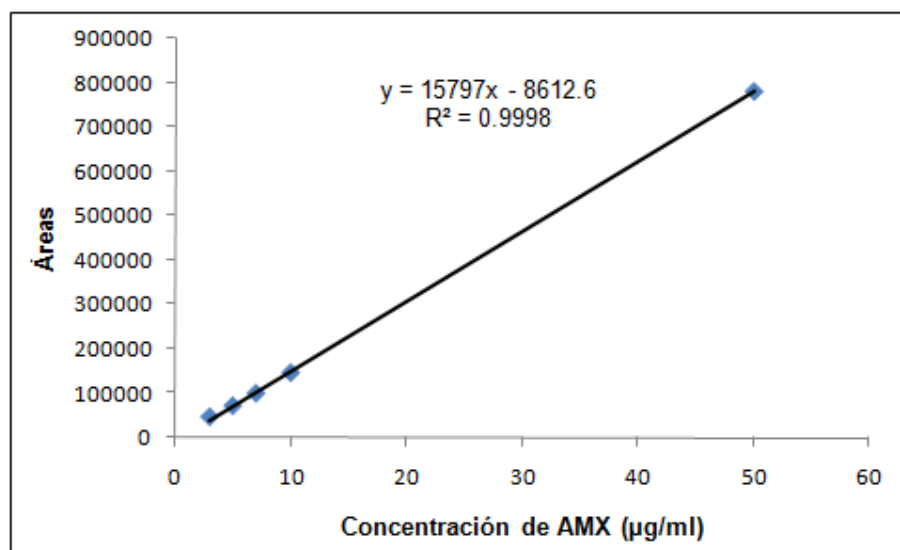
**Tabla 5.13.** Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal  $y=a+bx$

Parámetro de origen	Valor	V.A	Parámetro de origen	Valor	V.A
Valor a	-8612,6		Valor b	15797	
Desviación estándar	2885,96		Desviación estándar	124,58	
Desviación estándar relativo	33,5 %		Desviación estándar relativo	0,788 %	<2 %
Intervalo de confianza*	(-17797;571,85)	Incluye el 0	Intervalo de confianza*	(15400,67;16193)	
T estadístico**	-1,98	<2,145	T estadístico**	126,798	>2,145

V.A = Valor aceptado.

\* Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95 %

\*\* Valor de T student para un nivel de significación  $P=0,05$  con el grado de libertad  $n-1=14$ .



**Figura 5.13.** Recta de calibrado de AMX por HPLC.

## 2. MLX

$$\text{Área} = A + B \times C$$

$$\text{Área} = 2888,8 + 155718 \times C$$

$$r = 0,9998, \quad r^2 = 0,9997$$

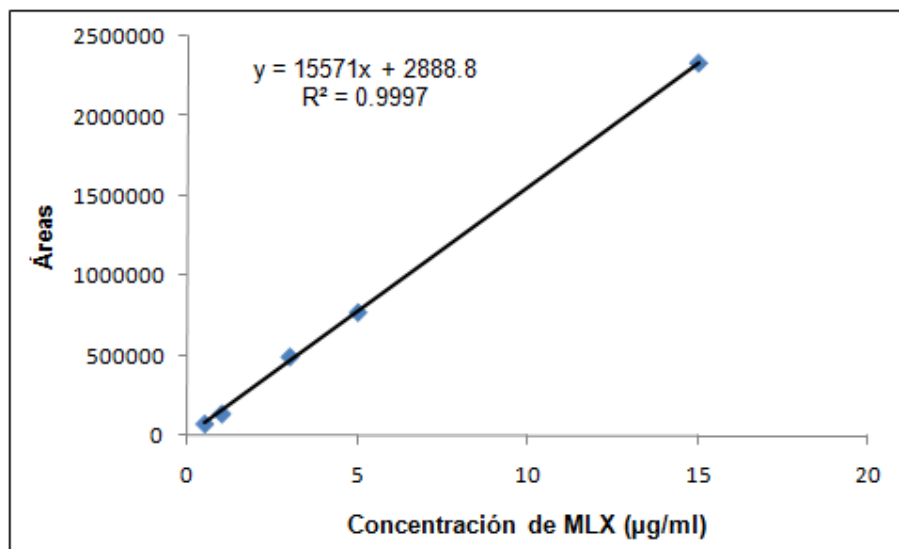
**Tabla 5.14.** Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal  $y=a+bx$ 

Parámetro de origen	Valor	V.A	Parámetro de origen	Valor	V.A
Valor a	2888,8		Valor b	155718	
Desviación estándar	6044,68		Desviación estándar	837,84	
Desviación estándar relativo	209,2 %		Desviación estándar relativo	0,53 %	<2 %
Intervalo de confianza*	(-10169,9;15947,5)	Incluye el 0	Intervalo de confianza*	(153907,9;157528)	
T estadístico**	0,478	<2,145	T estadístico**	185,85	>2,145

V.A = Valor aceptado.

\* Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95 %

\*\* Valor de T student para un nivel de significación  $P=0,05$  con el grado de libertad  $n-1=14$ .

**Figura 5.14.** Recta de calibrado de AMX por HPLC.

Los buenos resultados del coeficiente de determinación, coeficiente de correlación y el análisis estadístico de valores de pendientes y origen permiten considerar que el

método es lineal para la cuantificación de ambos principios activos en el intervalo de trabajo.

### 5.4.3. Precisión

#### Repetibilidad

La repetibilidad del método se determina a través de coeficiente de variación (C.V.) . Se preparan las tres soluciones madres de los dos principios activos, analizándose los tres niveles de concentración alta, media y baja. Los valores obtenidos en áreas y sus C.V. se representan en las tablas 5.15 y 5.16.

**Tabla 5.15.** Precisión del método mediante el estudio de repetibilidad para AMX a los tres niveles de concentración.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	3 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml
1	46612,6	75040,2	772694,0
	46444,3	77426,9	787737,4
	46303,8	74833,8	786141,6
2	47464,8	75084,3	766781,3
	45384,7	76472,8	788036,9
	48936,9	71049,1	791866,3
3	49359,2	74645,5	797119,0
	48622,1	75716,1	746629,9
	47646,7	69803,7	803112,0
$\bar{x} \pm SD$	47419,5±1348,71	74452,3±2465,87	782235,4±17417,35
C.V	2,23 %	3,31 %	2,84 %

**Tabla 5.16.** Precisión del método mediante el estudio de repetibilidad para MLX a los tres niveles de concentración.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	0,5 µg/ml	5 µg/ml	15 µg/ml
1	76239,4	773093,6	2295887,5
	76686,7	797681,6	2345496,5
	76062,4	770967,0	2362682,5
2	75977,6	773547,4	2361189,2
	81829,0	787852,5	2360705,1
	78466,2	731975,9	2297241,1
3	80026,0	769027,2	2255142,3
	80810,8	780046,0	2435833,7
	82481,9	719144,7	2335997,5
$\bar{x} \pm SD$	78731,1±2617,94	764037,3±25404,31	2338908,4±51945,72
C.V	2,22 %	3,31 %	3,33 %

Los valores de C.V. son aceptables ya que el valor más alto es de 3,33 %. Se puede considerar que el método tiene buena repetibilidad para la determinación de ambos fármacos.

### Precisión intermedia

Para ello, se analizan tres concentraciones distintas en tres días distintos (ver Tablas 5.17 y 5.18 ).



#### 5.4. ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE AMX Y MLX POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

**Tabla 5.17.** Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX

DÍAS	Áreas equivalentes a las concentraciones		
	3µg/ml	5µg/ml	50µg/ml
1	50291,6	70447,8	772266,5
	52280,1	71166,7	792988,5
	52642,8	69057,1	783860,5
2	47464,8	68450,7	766780,8
	45384,7	69466,0	788036,4
	48936,9	67536,7	791865,8
3	47265,1	66027,8	809904,2
	46642,0	68354,9	774520,0
	46598,2	69498,0	793479,7
$\bar{x} \pm SD$	46835,1 ± 373,02	67960,2 ± 1768,41	792634,6 ± 17707,25
C.V.	0,80 %	2,60 %	2,23 %

**Tabla 5.18.** Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX

DÍAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	0,5 µg/ml	5 µg/ml	15 µg/ml
1	74851,8	773938,0	2325145,1
	77894,6	769874,8	2342640,4
	77894,6	769874,8	2342640,4
2	90845,4	773093,6	2295887,5
	92745,8	797681,6	2345496,5
	91795,6	770967,0	2362682,5
3	76717,1	795377,9	2325943,9
	77231,4	821845,0	2311879,9
	77700,3	774604,5	2350598,6
$\bar{x} \pm SD$	77216,3 ± 491,76	797275,8 ± 23677,36	2329474,1 ± 19599,30
C.V.	0,64 %	2,97 %	0,84 %

Los valores de C.V. en estos casos tuvieron un valor máximo de 2,97 %, lo cual permite considerar que el método tiene buena precisión intermedia para la determinación de los principios activos.

#### 5.4.4. Exactitud

La exactitud se analiza mediante la recuperación de los analitos a partir de las muestras placebo a las que se ha adicionado tres concentraciones distintas de MLX y AMX.

Los placebos usados en estos estudios corresponden a los placebos de dos formulaciones seleccionadas para el estudio de estabilidad, que son formulaciones *MLX:AMX:Sacarina* y *MLX:AMX:CD*

Los resultados se muestran en las Tablas 5.19-5.22.

**Tabla 5.19.** Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación *MLX:AMX:CD* para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX.

Conc. de AMX adicionado a la muestra	Conc. de AMX recuperado (µg/ml)	% recuperado
Muestra + 3µg/ml AMX	3,10	103,30
	3,04	101,23
	3,01	100,27
Muestra+5µg/ml AMX	4,93	98,54
	4,99	99,77
	4,93	98,68
Muestra+50µg/ml AMX	50,38	100,77
	49,53	99,05
	50,10	100,19
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		100,20 $\pm$ 1,48
C.V		1,48 %

5.4. ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE AMX Y MLX POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

**Tabla 5.20.** Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación *MLX:AMX:CD* para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX.

Conc. de AMX adicionado a la muestra	Conc. de AMX recuperado (µg/ml)	% recuperado
Muestra + 3µg/ml AMX	2,90	96,51
	2,87	95,52
	2,92	97,31
Muestra+5µg/ml AMX	4,98	99,53
	5,26	105,15
	5,10	102,00
Muestra+50µg/ml AMX	50,68	101,36
	48,40	96,79
	50,91	101,82
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		99,35 $\pm$ 3,24
C.V		3,24 %

**Tabla 5.21.** Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación *MLX:AMX:CD* para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX.

Conc. de AMX adicionado a la muestra	Conc. de AMX recuperado (µg/ml)	% recuperado
Muestra + 0,5µg/ml AMX	0,49	98,79
	0,50	99,97
	0,49	97,50
Muestra+5µg/ml AMX	5,15	102,95
	4,99	99,89
	4,89	97,70
Muestra+15µg/ml AMX	14,55	97,00
	15,28	101,89
	15,16	101,05
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		99,64 $\pm$ 2,07
C.V		2,08 %

**Tabla 5.22.** Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación *MLX:AMX:CD* para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX.

Conc. de AMX adicionado a la muestra	Conc. de AMX recuperado (µg/ml)	% recuperado
Muestra + 0,5µg/ml AMX	0,49	98,44
	0,52	103,92
	0,51	102,58
Muestra+5µg/ml AMX	5,15	102,95
	4,99	99,89
	4,89	97,70
Muestra+50µg/ml AMX	14,55	97,00
	15,28	101,89
	15,16	101,05
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		100,60 $\pm$ 2,47
C.V		2,47 %

Ambos analitos en los dos placebos estudiados presentan una recuperación del 99,35 % a 100,60 % con un valor máximo de C.V de 2,25 %. Por lo tanto, se ha demostrado que no hay retención y pérdidas de los analitos. A partir de los resultados de la validación se considera que el método HPLC para la determinación simultanea de AMX y MLX en los productos terminados durante los estudios de estabilidad es selectivo, lineal, preciso y exacto.

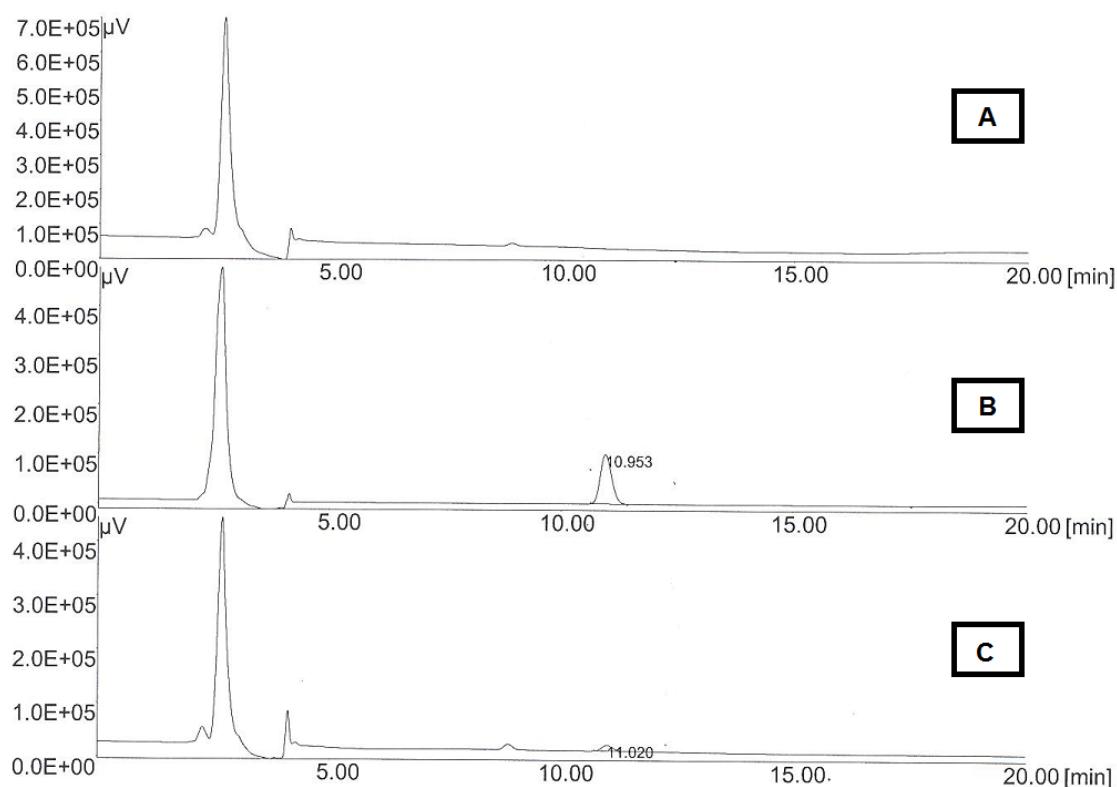
#### 5.4.5. Sensibilidad

Para AMX, los límites de detección y de cuantificación del método encontrados mediante la relación entre señal y ruido son 1,3 µg/ml y 2,3 µg/ml respectivamente.

Para MLX, los límites de detección y de cuantificación del método en función a la relación entre señal y ruido son 0,01µg/ml y 0,02 µg/ml respectivamente.

## 5.5. Método analítico para determinación de AMX y MLX en los estudios farmacocinéticos

El método de HPLC validado en el apartado anterior ha demostrado ser adecuado para la determinación de MLX en muestras biológicas ya que el placebo de estas muestras no interfiere con el pico de MLX (ver fig. 5.15).



**Figura 5.15.** Cromatogramas de A) blanco de plasma, B) patrón de AMX y MLX correspondientes a concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ , C) plasma cargada de AMX y MLX a concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente

Sin embargo, el método no es selectivo para la determinación de AMX en las muestras de plasma ya que las proteínas plasmáticas también tienen un tiempo de retención aproximadamente igual al de este fármaco (2-3 minutos). Por lo tanto, las determinaciones de MLX y AMX en las muestras biológicas se van a analizar por dos métodos separados. MLX se valora según el método validado en el apartado anterior y AMX se determina según un nuevo método de HPLC detallado a continuación.

Se emplea el mismo equipo de HPLC con la misma fase estacionario, sólo se cambia la fase móvil que es tampón dihidrógeno fosfato potásico: Trietilamina: Ace-

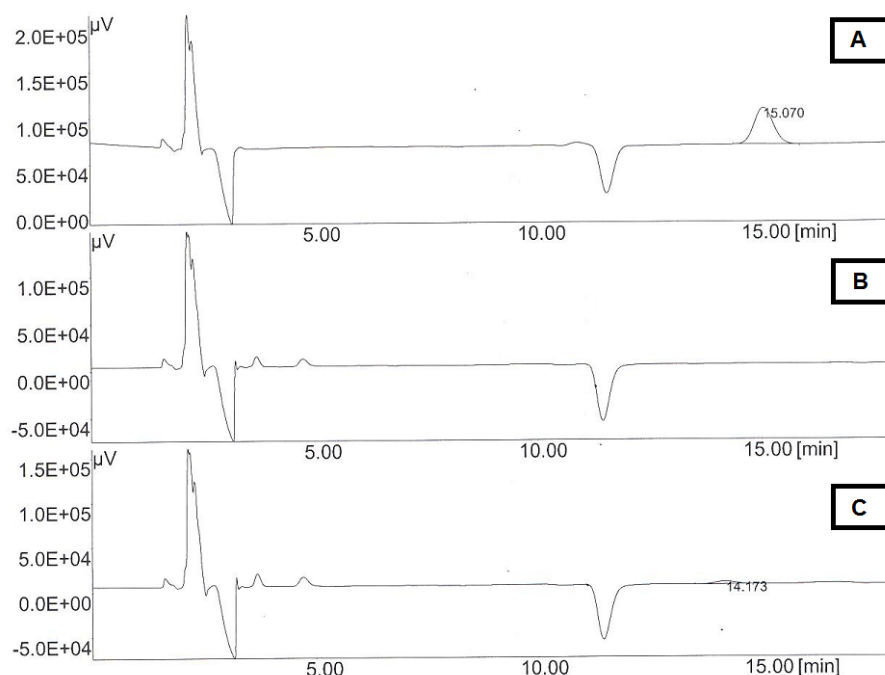
tonitrilo (1000:7:40). El flujo es de 1,5 ml/min. La longitud de onda usada es 230 nm.

Para la preparación de las muestras biológicas se trabaja de la manera siguiente: a un volumen aproximado de 250  $\mu$ l de plasma se añade 1ml del metanol como agente desproteinizante, se agita bien en el vortex durante 1 minuto, luego se centrifuga a 5000 rpm durante 30 minutos, se recoge el sobrenadante y se mezcla bien con 1 ml de agua. Se filtra la mezcla final a través del filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m y se inyecta al equipo de HPLC.

Preparación de las soluciones patrón a inyectar: a partir de la solución madre de AMX (25 mg de AMX disuelta en agua en un matraz de 25 ml), se diluye con metanol: agua [1, 2] para obtener las distintas soluciones patrón (ver fig. 5.16).

### 5.5.1. Selectividad

Se han comparado los cromatogramas del patrón de AMX, el plasma y el plasma cargado de principio activo. Se ve que al tiempo de retención en cuestión, 15 minutos, que corresponde a la AMX no hay ninguna interferencia (ver fig. 5.16). Por lo tanto el método es selectivo para la determinación de AMX.



**Figura 5.16.** Cromatogramas de A) patrón de AMX a concentración de 20  $\mu$ g/ml, B) de plasma, C) de plasma cargada de AMX y MLX a concentración de 1  $\mu$ g/ml.

### 5.5.2. Linealidad

Se construyen la recta de calibración a partir de cinco puntos de concentración en el intervalo de 1 a 10 µg/ml. Las determinaciones se hacen por triplicado. Sus resultados se muestran en la figura obteniéndose la siguiente recta de regresión:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

$$\text{Área} = -745,1 + 87297 \times C$$

$$r = 0,9998, \quad r^2 = 0,9997$$

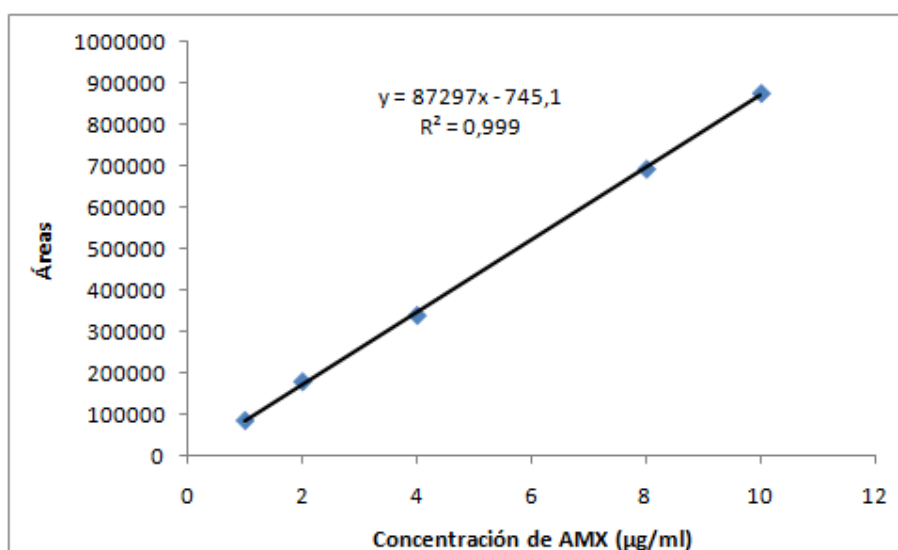
**Tabla 5.23.** Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal  $y=a+bx$

Parámetro de origen	Valor	V.A	Parámetro de origen	Valor	V.A
Valor a	-745,1		Valor b	87297	
Desviación estándar	39214,5		Desviación estándar	646,4	
Desviación estándar relativo	904,4 %		Desviación estándar relativo	0,74 %	<2 %
Intervalo de confianza*	(-89053,4;80381,9)	Incluye el 0	Intervalo de confianza*	(85859,1;88652,2)	
T estadístico**	-0,11	<2,145	T estadístico**	134,98	>2,145

V.A = Valor aceptado.

\* Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95 %

\*\* Valor de T student para un nivel de significación  $P=0,05$  con el grado de libertad  $n-1=14$ .



**Figura 5.17.** Recta de calibrado de AMX por HPLC.

Los buenos resultados del coeficiente de correlación ( $r$ ), del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y análisis estadístico de pendiente y origen de la recta de calibrado han permitido considerar que este método es lineal para la cuantificación de AMX en el rango de concentración de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.5.3. Precisión

#### Repetibilidad

La repetibilidad del método se determina a través del coeficiente de variación (C.V.) Se preparan tres soluciones madres, analizándose una concentración baja de 1  $\mu\text{g/ml}$ , una concentración media de 4  $\mu\text{g/ml}$  y una concentración alta de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores obtenidos en áreas y sus C.V. se representan en la Tabla 5.24.

**Tabla 5.24.** Precisión del método mediante el estudio de repetibilidad para AMX a los tres niveles de concentración.

MUESTRAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	1 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
1	90015,6	346712,9	877183,2
	84267,1	334824,2	872783,5
	86303,8	340383,5	880605,4
2	87464,8	351842,7	867866,7
	85384,7	347427,9	877803,6
	88936,5	331104,9	899866,1
3	84359,2	356110,5	867961,9
	88622,1	327681,0	844963,9
	87646,7	349780,3	881124,8
$\bar{x} \pm SD$	87000,1 $\pm$ 2050,78	342429,8 $\pm$ 9270,1	874462,2 $\pm$ 14597,8
C.V	2,36 %	2,71 %	1,67 %

Los valores de C.V. en estos casos tienen el valor máximo de 2,71 %, lo cual permite considerar que el método tiene buena repetibilidad para la determinación de AMX.



### Precisión intermedia

Se analizan tres concentraciones distintas en tres días distintos. Los resultados obtenidos son:

**Tabla 5.25.** Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia para muestras a las que se les adiciona un 75 % (22,5 µg/ml), un 100 % (30 µg/ml) y un 125 % (37,5 µg/ml) de MLX

DÍAS	Absorbancias equivalentes a los porcentajes:		
	1 µg/ml	4 µg/ml	10 µg/ml
1	90015,6	346712,9	877183,2
	84267,1	334824,2	872783,5
	86303,8	340383,5	880605,4
2	88355,6	369852,1	881690,4
	86231,4	352296,1	857893,6
	91027,8	371029,3	879566,9
3	89569,1	361510,9	896192,2
	86282,1	368719,0	839639,1
	84536,7	359681,3	911124,8
$\bar{x} \pm SD$	87398,8 ± 2435,44	356112,2 ± 13302,3	877408,8 ± 20468,3
C.V	2,79 %	3,43 %	2,33 %

Los valores del C.V no son superiores al 5 %, por lo cual se puede considerar que el método tiene una buena precisión intermedia para la cuantificación de AMX.

#### 5.5.4. Exactitud

La exactitud del método se analiza mediante la recuperación del analito a partir de las muestras placebo de plasma a las que se han adicionado tres concentraciones distintas de AMX. Y los resultados obtenidos se representan en la tabla 5.26.

**Tabla 5.26.** Resultados del estudio de exactitud de AMX en presencia del placebo correspondiente a la formulación *MLX:AMX:CD* para las muestras a las que se les adicionan los tres niveles de concentraciones de AMX.

Conc. de AMX adicionado a la muestra	Conc. de AMX recuperado (µg/ml)	% recuperado
Muestra + 1,001 µg/ml AMX	1,00	100,43
	1,00	97,99
	1,00	98,81
Muestra+3 µg/ml AMX	31,19	104,61
	31,40	105,31
	30,28	101,56
Muestra+10µg/ml AMX	97,69	97,69
	96,55	96,55
	100,04	100,04
Nº de muestras		9
$\bar{x} \pm SD$		100,33 $\pm$ 3,04
C.V		3,02 %

La recuperación es de  $100,33 \pm 3,04\%$  con los valores de C.V no superiores al 5 %, a partir de estos resultados se puede considerar que el método desarrollado es exacto.

En conclusión, el método desarrollado para la determinación de AMX en las muestras de sangre para el estudio farmacocinético de AMX ha demostrado ser específico, lineal, exacto y preciso.

#### 5.5.5. Sensibilidad

Los límites de detección y de cuantificación del método encontrado según la relación entre señal y ruido son 0,02 µg/ml y 0,04 µg/ml respectivamente.

## Bibliografía

- [1] I. H. T. Guideline, *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. ICH Topic Q2B (CPMP/ICH/281/95).
- [2] E. Souri, M. Amanlou, H. Farsam, and A. Afshari, "A rapid derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of naphazoline and antazoli-

- ne in eye drops.," *Chemical & pharmaceutical bulletin*, vol. 54, pp. 119–22, Jan. 2006.
- [3] J. Karpińska, "Derivative spectrophotometry-recent applications and directions of developments.," *Talanta*, vol. 64, pp. 801–22, Nov. 2004.
- [4] V. Rodenas, M. Garcíá, C. Sánchez Pedreño, and M. Albero, "Simultaneous determination of propacetamol and paracetamol by derivative spectrophotometry," *Talanta*, vol. 52, pp. 517–523, June 2000.
- [5] B. S. Nagaralli, J. Seetharamappa, and M. B. Melwanki, "Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxycillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 29, pp. 859–64, July 2002.

## Capítulo 6

# Selección de excipientes mediante el estudio de coeficiente de solubilidad

MLX se caracteriza por presentar una escasa solubilidad en agua (0,014 mg/ml) y en medios ácidos, con lo que este hecho constituye una dificultad en preparar formulaciones farmacéuticas, especialmente en formas líquidas inyectables. Con el fin de aumentar la solubilidad de MLX se estudió la solubilidad máxima de MLX en medios básicos utilizando para ello diversos excipientes y de esta manera poder contribuir a aumentar su eficacia de acción.

La preformulación se realizó en cuatro etapas, modificando los medios de disolución y seleccionando las proporciones de excipientes que conseguían mejorar notablemente la concentración de saturación del MLX. Las cuatro etapas que se utilizaron se describen a continuación:

### 6.1. Efecto de distintos excipientes sobre la solubilidad de MLX

En la primera etapa, se estudió la concentración a saturación de MLX en distintas proporciones de tampones con un pH entre 7,4 y 9,8. A estos tampones se les añadieron distintos excipientes (tabla 6.1). Las soluciones tampón utilizadas (ver capítulo 4) fueron las siguientes: pH 7,4, pH 8,8 de glicina 0,023 M y pH 9,8. Los excipientes utilizados son comúnmente utilizados en el laboratorio y además, en todos los casos, son aptos para uso parenteral. Entre los excipientes utilizados encontramos: surfactantes (Tween 80<sup>®</sup>, Span 85<sup>®</sup> y Lecitina de soja), azúcares (manitol, glucosa y sorbitol), sacarina sódica y un polímero de naturaleza aniónica (carboximetil celulosa sódica).

Se prepararon las disoluciones de excipientes en agua destilada a la concentración máxima permitida para formulaciones parenterales. Estas disoluciones de máxima concentración permitida de los excipientes se consideran el 100 %, a partir de ellas se preparan los sistemas tampón- excipiente a distintas proporciones.

La cuantificación de la influencia de cada excipiente en la solubilidad de MLX se obtuvo por la ecuación de Setchenow [1] como se muestra a continuación:

$$\log \left( \frac{S}{S_a} \right) = k f_a \quad (6.1)$$

donde:

$S$ ,  $S_a$ : solubilidad de soluto en la ausencia y presencia de excipiente.

$k$ : potencial de solubilización.

$f_a$ : fracción de volumen de excipiente.

Los valores de  $k$  se obtuvieron a partir de la relación de  $\log(S/S_a)$  frente  $f_a$  con valores de  $f_a$  mayores que 0.2.

**Tabla 6.1.** Potencial de solubilización ( $k$ ) de MLX para varios tampones con diferentes excipientes.

Sistemas	Tween 80 <sup>®</sup> (10 %)	Span 85 <sup>®</sup> (10 %)	Lecitina de soja (2,3 %)	Manitol (5 %)	Glucosa (2 %)	Sorbitol (2 %)	Sacarina sódica (0,8 %)	Carboximetilcelulosa (5 %)
Tampón pH 7,4	-0,3023	-0,1915	0,2515	-0,0101	-0,7551	-0,0973	-0,8295	0,1975
Tampón pH 8,8	-0,0300	0,1484	0,0485	0,2520	0,2770	0,1841	-0,1565	0,3036
Tampón pH 9,8	-0,0114	0,0629	0,2306	-0,0372	-0,8216	0,3823	-0,9263	0,1453

En la tabla 6.1, se presentan los valores obtenidos de potencial de solubilización  $k$  en los sistemas estudiados. El signo y magnitud de  $k$  es una medida para observar el efecto que produce la presencia de excipientes en la solubilidad del soluto. La magnitud de los valores de  $k$  da una comparación cuantitativa del potencial de solubilización de varios sistemas. El signo positivo de  $k$  a partir de las concentraciones de aditivos mayores o iguales a 20 % (v/v) significa que la solubilidad de MLX disminuye en presencia de un determinado cosolvente.

Los coeficientes de solubilidad de MLX en los tampones de pHs 7,4; 8,8 y 9,8 se representan en las tablas 6.2-6.4, respectivamente. La solubilidad de MLX es

muy baja en agua (0,014 mg/ml), incrementándose notablemente en los medios de tampón de pH 7,4 (0,701 mg/ml); pH 8,8 (4,116 mg/ml) y pH 9,8 (19,048 mg/ml). Por lo tanto a medida que aumenta el pH hasta el valor 9,8, aumenta la solubilidad del MLX en pHs superior a sus dos pKas ( $pK_{a1}=1.09$ ,  $pK_{a2}=4.18$ ) [2], debido a la ionización parcial de su molécula, que se presenta principalmente en su forma aniónica.

El incremento de la solubilidad de diversos principios activos en presencia de distintos excipientes ha sido descrito por numerosos autores [3, 4]. En los sistemas con un 100 % de excipiente, la solubilidad de MLX también aumentó. La solubilidad del principio activo en las disoluciones de surfactantes Tween<sup>®</sup> 80 (0,073 mg/ml), Span<sup>®</sup> 85 (0,063mg/ml) y lecitina de soja (0,036 mg/ml) respectivamente, mostraron un aumento en comparación con los resultados obtenidos en agua. Este hecho se ha debido a que los excipientes utilizados presentaban concentraciones superiores a la concentración mínima micelar (CMC). Por lo tanto se formaron micelas, de esta forma las partes no polares del MLX se incluyeron en el interior de las mismas [5]. Por otra parte, a excepción de la disolución de manitol donde la solubilidad acuosa de MLX no mejora (0,014 mg/ml), se observaron que se mejoró la concentración de saturación del principio activo en las disoluciones de los siguientes excipientes: glucosa (0,189 mg/ml), sorbitol (0,046 mg/ml), sacarina sódica (0,250 mg/ml), y carboximetilcelulosa (0,103 mg/ml). El efecto de estos excipientes en la solubilidad de MLX se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los mismos con los grupos polares de MLX ya que esta sustancia activa es un compuesto aromático que posee varios grupos polares que contienen oxígeno, nitrógeno y azufre. [5]. Además, en el caso de la sacarina sódica (es una agente hidrotrópico), al tener este compuesto una estructura parecida al de la sustancia activa, ayuda a la solubilización de la misma mediante la formación de complejos.

La tabla 6.2 muestra los coeficientes de solubilidad de MLX en los sistemas de tampón pH 7,4 - excipiente. El Tween<sup>®</sup> 80 y el Span<sup>®</sup> 85 mejoran la solubilidad del fármaco en las proporciones tampón: excipiente (v/v) 80:20, 60:40, incluso 40:60 respecto al tampón sólo al 100 %. A pH 7,4 el MLX no está del todo ionizado, ya que este pH no está muy alejado de su segundo pKa, por lo tanto las micelas formadas por los surfactantes son las responsables de disminuir la tensión superficial de las moléculas de MLX con el agua mediante la internación de las mismas en su parte apolar [5].

También se observa un incremento de la solubilidad de MLX en los sistemas de

tampón pH 7,4 – azúcares debido a la formación de puentes de hidrógeno con los grupos polares de MLX [5] y en el caso de la sacarina sódica, influye también la estructura molecular que es muy parecida a la del principio activo.

Entre los excipientes utilizados, el Tween<sup>®</sup> 80 y la sacarina sódica son los que más incrementan la solubilidad de MLX obteniendo valores en la proporción 60:40 (v/v) del sistema tampón – excipiente de 1,416 mg/ml y 0,944 mg/ml respectivamente. Por lo tanto sus valores de  $k$  son más negativos (ver tabla 6.1). No obstante, no se observa ninguna mejoría en el tampón - lecitina de soja y en el tampón -carboximetilcelulosa sódica. El poco efecto que tuvo la lecitina de soja en el incremento de solubilidad de MLX posiblemente se debe a sus propiedades fisicoquímicas, ya que suele usarse para formar emulsiones A/O [6] por lo tanto sus micelas no se forman bien en agua en comparación con Tween<sup>®</sup> 80 y Span<sup>®</sup> 85. En el caso de la carboximetilcelulosa sódica, la baja solubilidad obtenida para el MLX se debe a las fuertes interacciones intermoleculares entre los grupos aniónicos de la carboxilmetil celulosa y de la glicina haciendo que el MLX se protone y precipite. Un fenómeno similar donde el MLX precipitaba por la interacción entre dos cosolventes fue descrito por Seedher, et al. [7].

A partir de los resultados obtenidos de solubilidad en los sistemas de tampón de pH 8,8- excipiente (tabla 6.3) se observa que los excipientes mejoran la concentración a saturación de MLX con respecto al tampón 100 % donde se alcanza la solubilidad máxima de MLX. Los sistemas tampón pH 8,8 – Tween<sup>®</sup>80 , manitol, glucosa y sacarina sódica en la proporción 80:20 (v/v) favorecen la solubilidad de MLX obteniendo unos valores de solubilidad superiores al tampón 100 %. Por lo tanto sus valores de  $k$  son negativos como se puede ver en la tabla 6.1. Por otro lado, la solubilidad del MLX en el sistema tampón-carboximetilcelulosa es peor incluso que en el sistema tampón- agua debido a una fuerte interacción intermolecular entre el mismo excipiente con la glicina del tampón. Sin embargo, los sistemas de Span<sup>®</sup> 85 y sorbitol con el tampón a pH 8,8 presentaron una mejoría al compararlos con el tampón- agua. Con respecto al surfactante Span<sup>®</sup> 85 ya no aumentan la concentración a saturación de MLX porque a este pH más alto, MLX está más polarizado, por lo tanto el mecanismo de solubilización mediante la formación de las micelas no es efectivo como en el caso del tampón pH 7,4.

La solubilidad de MLX en los sistemas de tampón de pH 9,8- excipiente se presenta en la tabla 6.4. En todos los casos se obtuvieron mejores valores de solubilidad con el tampón sólo, sin excipientes. El mejor valor de solubilidad (19,729 mg/ml)

se logró con el tampón- sacarina sódica a 80:20 (v/v). El incremento en la solubilidad de MLX en estos sistemas, posiblemente, es debido a la presencia de un medio con un pH óptimo para su ionización y una cantidad adecuada de grupos polares que aportan la sacarina sódica y la glucosa favoreciendo la aparición de puentes de hidrógeno.

Con la sacarina sódica se alcanzan los mejores valores de solubilidad, debido a que su estructura es muy parecida a la de MLX, cumpliéndose la regla de “parecido disuelve a parecido”, asimismo, este excipiente es un potente agente hidrotrópico [8] que tiene la capacidad de formar complejos con algunos fármacos, como el MLX. Sin embargo, los tampones- surfactantes, tampón- sorbitol, tampón- carboximetilcelulosa mostraron peores resultados que el tampón- agua. Los surfactantes no son tan efectivos cuando las moléculas de MLX se presentan principalmente en su forma ionizada. Por otra parte, la concentración de glicina es mayor en este tampón y aumentará más la concentración de protones en el medio provocando que la carboximetilcelulosa compita más con el MLX empujándolo a protonarse, causando la precipitación del fármaco. Respecto al comportamiento del sorbitol, ya que a diferencia de los otros azúcares de forma dextro, se utilizó en su mezcla racémica, existe una competencia entre los estereoisómeros sobre los grupos OH impidiendo la formación de puentes de hidrógeno entre el excipiente y el MLX, no mejorando la solubilización del mismo como con la glucosa y el manitol. La interpretación de los resultados de  $k$  coincide con las observaciones a partir de los resultados anteriores ya que los potenciales de solubilización de los surfactantes, sorbitol y carboximetilcelulosa sódica son positivos. Sin embargo, en el tampón-manitol, glucosa y sacarina si ayudan a la solubilidad ya que sus valores de  $k$  son negativos. A partir de los resultados obtenidos, entre los excipientes utilizados la sacarina sódica es la mejor ya que el valor de  $k$  es el más negativo de todos (ver tabla 6.1)



**Tabla 6.2.** Solubilidad de MLX con diferentes excipientes y tampón pH 7,4

pH 7,4	Exp. -->	Solubilidad media (mg/ml) $\pm$ DS							
		Agua	Tween® (10 %)	Span® (10 %)	85	Lecitina de soja (2,3 %)	Manitol (5 %)	Glucosa (2 %)	Sorbitol (2 %)
0	100	0,014 $\pm$ 0,001	0,073 $\pm$ 0,015	0,063 $\pm$ 0,002	0,036 $\pm$ 0,005	0,014 $\pm$ 0,01	0,189 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,004	0,250 $\pm$ 0,019
10	90	0,386 $\pm$ 0,004	0,469 $\pm$ 0,030	0,527 $\pm$ 0,025	0,220 $\pm$ 0,009	0,362 $\pm$ 0,018	0,416 $\pm$ 0,015	0,455 $\pm$ 0,008	0,556 $\pm$ 0,021
20	80	0,523 $\pm$ 0,016	0,701 $\pm$ 0,030	0,650 $\pm$ 0,012	0,33 $\pm$ 0,009	0,499 $\pm$ 0,017	0,569 $\pm$ 0,023	0,576 $\pm$ 0,018	0,724 $\pm$ 0,024
40	60	0,611 $\pm$ 0,008	0,945 $\pm$ 0,022	0,713 $\pm$ 0,013	0,403 $\pm$ 0,024	0,630 $\pm$ 0,023	0,706 $\pm$ 0,020	0,724 $\pm$ 0,030	0,893 $\pm$ 0,029
60	40	0,631 $\pm$ 0,010	1,416 $\pm$ 0,023	0,847 $\pm$ 0,027	0,473 $\pm$ 0,005	0,698 $\pm$ 0,010	0,769 $\pm$ 0,009	0,780 $\pm$ 0,008	0,944 $\pm$ 0,017
80	20	0,653 $\pm$ 0,003	1,201 $\pm$ 0,012	0,966 $\pm$ 0,018	0,576 $\pm$ 0,016	0,756 $\pm$ 0,010	0,790 $\pm$ 0,010	0,858 $\pm$ 0,015	0,907 $\pm$ 0,008
100	0	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015	0,701 $\pm$ 0,015

**Tabla 6.3.** Solubilidad de MLX con diferentes excipientes y tampón pH 8,8

pH 8,8	Exp. -->	Solubilidad media (mg/ml) $\pm$ DS							
		Agua	Tween® (10 %)	Span® (10 %)	85	Lecitina de soja (2,3 %)	Manitol (5 %)	Glucosa (2 %)	Sorbitol (2 %)
0	100	0,014 $\pm$ 0,001	0,073 $\pm$ 0,015	0,063 $\pm$ 0,002	0,036 $\pm$ 0,005	0,014 $\pm$ 0,01	0,189 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,004	0,250 $\pm$ 0,019
10	90	0,713 $\pm$ 0,085	0,972 $\pm$ 0,092	0,876 $\pm$ 0,057	0,678 $\pm$ 0,068	0,741 $\pm$ 0,013	0,676 $\pm$ 0,052	0,749 $\pm$ 0,216	0,875 $\pm$ 0,027
20	80	1,297 $\pm$ 0,043	1,520 $\pm$ 0,053	1,382 $\pm$ 0,099	1,345 $\pm$ 0,085	1,309 $\pm$ 0,078	1,245 $\pm$ 0,027	1,037 $\pm$ 0,025	1,58 $\pm$ 0,039
40	60	2,059 $\pm$ 0,096	2,671 $\pm$ 0,117	2,326 $\pm$ 0,061	1,975 $\pm$ 0,089	2,884 $\pm$ 0,365	2,673 $\pm$ 0,129	2,055 $\pm$ 0,085	2,933 $\pm$ 0,028
60	40	2,971 $\pm$ 0,026	4,219 $\pm$ 0,085	3,878 $\pm$ 0,085	2,072 $\pm$ 0,106	3,906 $\pm$ 0,101	3,646 $\pm$ 0,146	3,129 $\pm$ 0,239	4,100 $\pm$ 0,250
80	20	3,165 $\pm$ 0,046	4,863 $\pm$ 0,0146	4,272 $\pm$ 0,069	3,654 $\pm$ 0,122	4,700 $\pm$ 0,098	4,716 $\pm$ 0,097	4,077 $\pm$ 0,161	4,992 $\pm$ 0,250
100	0	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056	4,416 $\pm$ 0,056

**Tabla 6.4.** Solubilidad de MLX con diferentes excipientes y tampón pH 9,8

pH 9,8	Exp. -->	Solubilidad media (mg/ml) $\pm$ DS										
		Agua	Tween® (10 %)	80	Span® (10 %)	85	Lecitina de soja (2,3 %)	Manitol (5 %)	Glucosa (2 %)	Sorbitol (2 %)	Sacarina sódica (0,9 %)	Carboximetil celulosa (5 %)
0	100	0,014 $\pm$ 0,001	0,073 $\pm$ 0,015		0,063 $\pm$ 0,002		0,036 $\pm$ 0,005	0,014 $\pm$ 0,01	0,189 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,004	0,25 $\pm$ 0,019	0,103 $\pm$ 0,024
10	90	3,29 $\pm$ 0,149	9,284 $\pm$ 0,049		9,045 $\pm$ 0,057		4,331 $\pm$ 0,396	3,738 $\pm$ 0,313	3,722 $\pm$ 0,380	1,36 $\pm$ 0,146	3,786 $\pm$ 0,084	1,684 $\pm$ 0,14
20	80	5,705 $\pm$ 0,250	10,165 $\pm$ 0,258		7,083 $\pm$ 0,897		5,802 $\pm$ 0,184	6,581 $\pm$ 0,028	5,981 $\pm$ 0,195	2,398 $\pm$ 0,352	6,273 $\pm$ 0,386	3,273 $\pm$ 0,487
40	60	10,293 $\pm$ 0,096	13,001 $\pm$ 0,342		10,245 $\pm$ 0,441		9,45 $\pm$ 0,184	10,991 $\pm$ 0,764	10,845 $\pm$ 0,129	5,867 $\pm$ 0,293	10,65 $\pm$ 0,512	3,906 $\pm$ 0,396
60	40	14,703 $\pm$ 0,074	13,471 $\pm$ 0,389		13,876 $\pm$ 0,056		12,288 $\pm$ 0,690	16,276 $\pm$ 0,637	18,173 $\pm$ 0,197	9,061 $\pm$ 0,441	18,594 $\pm$ 0,122	8,526 $\pm$ 0,688
80	20	19,784 $\pm$ 0,028	17,508 $\pm$ 0,512		13,909 $\pm$ 0,386		13,654 $\pm$ 0,122	19,146 $\pm$ 0,156	19,243 $\pm$ 0,202	13,358 $\pm$ 0,202	19,729 $\pm$ 0,197	12,044 $\pm$ 0,414
100	0	19,048 $\pm$ 0,277	19,048 $\pm$ 0,278		19,048 $\pm$ 0,279		19,048 $\pm$ 0,280	19,048 $\pm$ 0,281	19,048 $\pm$ 0,282	19,048 $\pm$ 0,283	19,048 $\pm$ 0,284	19,048 $\pm$ 0,285

## 6.2. Efecto de los excipientes sobre la solubilidad de MLX en el tampón pH 11,2

En la segunda etapa de los estudios de preformulación se estudió la influencia del incremento de pH hasta 11,2 en el incremento de solubilidad de MLX. Se seleccionaron los excipientes donde se obtuvieron los mejores valores de solubilidad de MLX en el tampón pH 11,2, los cuales fueron: Tween<sup>®</sup> 80, manitol, glucosa y sacarina sódica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.5.

**Tabla 6.5.** Solubilidad de MLX con diversos excipientes y tampón pH 11,2 en proporción 80:20 (v/v).

Tampón pH 11,2	Excipiente (%) --→	Solubilidad media (mg/ml) ± DS			
		Tween <sup>®</sup> 80 (10 %)	Manitol (5 %)	Glucosa (2 %)	Sacarina sódica (0,9 %)
80	20	22,388± 1,910	8,056±1,362	9,757±0,786	12,489±1,434
100	0	14,650±0,919	14,650±0,919	14,650±0,919	14,650±0,919

Se esperaba que la solubilidad de MLX aumentara al aumentar el pH. Pero los resultados obtenidos han demostrado lo contrario debido, posiblemente, a un fenómeno de precipitación. Se cree que el MLX se solubiliza rápidamente en el sistema 100 % de tampón pH 11,2 en su forma aniónica, y al estar en contacto con un medio altamente polar, por la gran cantidad de iones presentes, el MLX vuelve a precipitar debido a su naturaleza de ión bipolar o zwiterion, que hace que posea un momento multipolar bastante acentuado [2]. Además, la presencia de excipientes polares como manitol, glucosa y sacarina sódica empeoran su solubilidad al aumentar la polaridad del medio. En la bibliografía encontramos el caso de pentaclorofenol, que es un ácido débil, y aumenta su solubilidad al aumentar el pH, pero a partir del pH 9 se registra un descenso de la solubilidad del mismo debido a una precipitación causada por el intercambio y reagrupación de los iones presentes en el medio [9]. En cambio al utilizar en nuestro estudio un surfactante no iónico como el Tween<sup>®</sup> 80 la concentración de saturación del MLX aumenta notablemente al disminuir la polaridad del sistema.

### 6.3. Efecto de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina sobre la solubilidad de MLX

A continuación se realizó la tercera parte de los estudios de preformulación, que consistieron en el estudio de la concentración a saturación de MLX, utilizando soluciones de distintas concentraciones de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) a diferentes pHs. La combinación del ajuste de pH y la formación de complejos con ciclodextrinas para mejorar la solubilidad de las sustancias activas ha sido descrita por varios autores [10, 11, 12]. A diferencia de la metodología de trabajo con los anteriores excipientes, se realizó la prueba de solubilidad preparando distintas soluciones de ciclodextrinas en agua o en los tampones pH 7,8; pH 8,8; pH 9,8, con las siguientes concentraciones en cada medio: 2,5 %, 5 %, 7,5 % y 10 % con el fin de mantener el pH del medio. El resultado se muestra en la tabla 6.6. Se observó que a medida que aumenta la concentración de HP- $\beta$ -CD aumenta la concentración de saturación de MLX, ya que a mayor cantidad de HP- $\beta$ -CD se podrían formar más complejos de inclusión entre el fármaco y el excipiente. Por esta razón la HP- $\beta$ -CD ayuda a solubilizar el MLX. En la figura 6.1 se muestran los diagramas de solubilidad de MLX con HP- $\beta$ -CD en agua y en los tampones de pH 7,4; 8,8 y 9,8 a 25 °C. El perfil de todas las curvas de solubilidad sigue un sistema tipo AL [13], es decir que la solubilidad del fármaco aumenta linealmente en función de la concentración de HP- $\beta$ -CD. Las pendientes de las curvas lineales en todos los casos es inferior a 1, por lo tanto se puede confirmar que el HP- $\beta$ -CD y MLX forman complejos de inclusión de proporción 1:1. A partir de la pendiente de la curva de solubilidad, se calculan las diferentes constantes de estabilidad de los complejos según la ecuación:

$$K_s = \text{pendiente} / S_0(1 - \text{pendiente}) \quad (6.2)$$

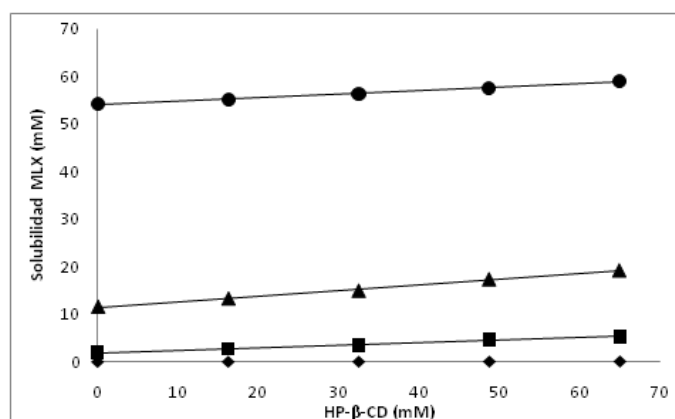
donde:

$K_s$ : constante aparente de solubilidad del complejo.

$S_0$ : solubilidad de MLX en ausencia de HP- $\beta$ -CD.

Los valores de  $K_s$  calculados son 37,56 M<sup>-1</sup> en agua; 29.16 M<sup>-1</sup> a pH 7.4, 11.85 M<sup>-1</sup> a pH 8.8 y 1.54 M<sup>-1</sup> a pH 9.8. A partir de estos resultados, se observa una interacción entre el MLX y las ciclodextrinas en medio básico, y en agua. Normalmente la molécula completa o una parte de la misma interacciona con la cavidad de

la ciclodextrina mediante interacciones no-covalentes, tales como las fuerzas de Van Der Waals, basadas en interacciones hidrófobas [14]. Por eso, cuanto más hidrófobas y apolares son las moléculas, más estables son los complejos formados. De esta forma la afinidad de MLX no ionizado por la ciclodextrina es mayor que la de las formas ionizadas. Teniendo en cuenta que en los medios básicos MLX se presenta en su forma ionizada no existe mucha afinidad de MLX por la HP- $\beta$ -CD. Gladys y col. [15] encontraron resultados similares en valores de Ks en agua y a pH básico. A pesar de que el Ks disminuye en medio básico la solubilidad total de MLX aumenta significativamente a pH 8,8 y pH 9,8. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible obtener una mayor solubilidad total de MLX usando la combinación de control de pH y formación complejo con HP- $\beta$ -CD. Por ejemplo, la solubilidad máxima de MLX en pH 8,8 es 4,416 mg/ml y aumenta hasta 6,127 mg/ml en la solución de 7,5 % HP- $\beta$ -CD en el mismo pH.



**Figura 6.1.** Diagramas de fase de solubilidad de MLX: HP- $\beta$ -CD en agua (♦), pH 7,4 (■), pH 8,8 (▲), pH 9,8 (●)

**Tabla 6.6.** Solubilidad de MLX en agua, y en tampones de pH 7,4: 8,8 y 9,8, a diferentes concentraciones de HP- $\beta$ -CD.

HP- $\beta$ -CD( %)	Solubilidad media (mg/ml) $\pm$ DS			
	Agua	pH 7,4	pH 8,8	pH 9,8
0	0,014 $\pm$ 0,006	0,701 $\pm$ 0,015	4,416 $\pm$ 0,056	19,048 $\pm$ 0,277
2,5	0,024 $\pm$ 0,001	0,978 $\pm$ 0,061	4,716 $\pm$ 0,053	19,360 $\pm$ 0,171
5,0	0,031 $\pm$ 0,001	1,236 $\pm$ 0,039	5,289 $\pm$ 0,074	19,760 $\pm$ 0,090
7,5	0,039 $\pm$ 0,001	1,628 $\pm$ 0,031	6,127 $\pm$ 0,023	20,250 $\pm$ 0,230
10,0	0,049 $\pm$ 0,001	1,873 $\pm$ 0,039	6,775 $\pm$ 0,039	20,782 $\pm$ 0,530

#### 6.4. Efecto de diferentes tampones pH 8,8 sobre la solubilidad de MLX

Se estudió la influencia del tampón 8,8, aumentando la concentración de glicina, en la solubilidad de MLX. Se prepararon tres tampones de pH 8,8 con cantidades crecientes de glicina hasta su máximo valor admitido para uso parenteral de 0,023 M, 0,027 M y 0,033 M según el método descrito en el apartado IV.1.3 obteniéndose las siguientes concentraciones de saturación: 4,416 mg/ml; 5,689 mg/ml; 7,326 mg/ml respectivamente. Se observó que la solubilidad de MLX aumenta a medida que aumenta la cantidad de glicina en el tampón pH 8,8. Por esta razón se hicieron pruebas de solubilidad adicionales combinando la utilización del tampón de pH 8,8 de glicina 0,033 M con los excipientes que habían incrementado más la solubilidad de MLX por separado (sacarina sódica y Tween<sup>®</sup> 80) y la mezcla de los dos últimos a su máxima concentración permitida en las formulaciones parenterales (Tabla 6.7). Se observó que el MLX se solubiliza mejor en los sistemas de tampón - excipiente que en el tampón sólo, alcanzando los mejores valores cuando se utiliza sacarina sódica.

**Tabla 6.7.** Solubilidad de MLX en tampón pH 8,8 de glicina 0,023 M; 0,027 M; 0,033 M y tampón de glicina 0,033 M con los excipientes elegidos

Excipientes	Tampón pH 8,8	Solubilidad $\pm$ SD (mg/ml)
Sacarina sódica 0,9 %	Glicina de 0,033 M	9,808 $\pm$ 0,081
Tween <sup>®</sup> 80 10 %	Glicina de 0,033 M	8,523 $\pm$ 0,170
Sacarina sódica 0,9 % +Tween <sup>®</sup> 80 10 %	Glicina de 0,033 M	9,499 $\pm$ 0,122
---	Glicina de 0,033 M	7,326 $\pm$ 0,737
---	Glicina de 0,027 M	5,689 $\pm$ 0,304
---	Glicina de 0,022 M	4,416 $\pm$ 0,056

#### 6.5. Obtención de formulaciones a partir de los estudios de solubilidad

En la primera etapa de preformulación, se prepararon diferentes formulaciones liofilizadas de MLX con una dosis de 5 mg/ml en función de los resultados obtenidos

en los estudios de solubilidad de MLX en varios sistemas con diferentes excipientes. Se tuvo en cuenta las exigencias de las formulaciones parenterales, como su solubilidad para el posterior cumplimiento de la prueba de reconstitución, el valor de pH y la posible toxicidad debida a los excipientes. Las formulaciones preparadas en la primera etapa son: MLX:CD, MLX:Sacarina, MLX:pH 8,8, MLX:Tween, MLX:Tween:Sacarina, MLX:pH 9,8, MLX:pH 9,8:Sacarina y MLX:pH 9,8:Tween (ver Tabla 4.1). Todas las formulaciones se encuentran en el rango permitido de pH 2 a 12 para inyectables de administración intramuscular e intravenosa [16]. Posteriormente, se caracterizaron las formulaciones obtenidas en la primera etapa mediante la prueba de reconstitución, determinación del rendimiento y pH. Los resultados de estos estudios se presentan en la Tabla 6.8.

**Tabla 6.8.** Prueba de reconstitución, aspecto de la solución reconstituida, riqueza y pH de las formulaciones preparadas en la primera etapa del estudio de preformulación

Formulación	Prueba de reconstitución	Aspecto de la solución reconstituida	Riqueza (%) $\pm$ DS	pH $\pm$ DS
MLX:CD	Disuelve rápidamente	Amarillo transparente	99,87 $\pm$ 0,053	8,23 $\pm$ 0,01
MLX:Sacarina	Disuelve rápidamente	Amarillo transparente	99,96 $\pm$ 0,041	8,35 $\pm$ 0,005
MLX:pH 8,8	Disuelve rápidamente	Amarillo opaco	99,85 $\pm$ 0,035	8,49 $\pm$ 0,016
MLX:Tween	NO se disuelve bien, queda en el fondo una masa de gelatina	---	---	---
MLX:Tween:Sacarina	NO se disuelve bien, queda en el fondo una masa de gelatina	---	---	---
MLX:pH 9,8	Disuelve rápidamente	Amarillo transparente	99,94 $\pm$ 0,031	9,23 $\pm$ 0,005
MLX:pH 9,8:Sacarina	Disuelve rápidamente	Amarillo transparente	99,94 $\pm$ 0,015	9,30 $\pm$ 0,011
MLX:pH 9,8:Tween	Disuelve rápidamente	Amarillo transparente	99,57 $\pm$ 0,021	9,32 $\pm$ 0,003

Entre las ocho formulaciones estudiadas, solamente dos formulaciones: MLX:Tween y MLX:Tween:Sacarina, no cumplieron con la prueba de reconstitución ya que no se disolvieron correctamente, debido a que poseían una gran cantidad de Tween<sup>®</sup> 80. Este surfactante es una sustancia cuya temperatura de congelación es baja [6] por lo tanto al liofilizar no se formaron polvos sino una masa pegajosa. Por esta razón no se incluyeron estas dos formulaciones en la determinación de riqueza y pH. Por otro lado, el resto de las formulaciones se disuelven de forma instantánea al añadir los 10 ml de agua destilada. Las disoluciones reconstituidas poseían un aspecto amarillo transparente claro, excepto la formulación MLX:pH 8,8. Se obtuvo la riqueza por triplicado de las formulaciones reconstituidas, y todas ellas cumplieron con la espe-

cificación (90-110 % de MLX). Finalmente se determinó el pH de las formulaciones reconstituidas observándose un descenso del mismo en todos los casos en comparación con el pH inicial de las disoluciones preparadas antes de su liofilización, y así el pH de la disolución final de la formulación MLX:CD es 8,23 mientras la disolución a liofilizar posee un pH tamponado de 8,8, incluso en las formulaciones MLX:pH 9,8, MLX:pH 9,8:Sacarina y MLX:pH 9,8:Tween donde se usa el tampón pH 9,8 el pH de las soluciones finales baja a 9,23; 9,30 y 9,32 respectivamente. Esto puede ser debido a la naturaleza ácida del MLX y de algunos excipientes.

De todas las formulaciones de MLX preparadas se escogieron dos formulaciones: MLX:CD y MLX:Sacarina ya que el medio utilizado para preparar las mismas es el tampón pH 8,8, más cercano al pH fisiológico y los excipientes de los dos sistemas proporcionaban los mejores valores de solubilidad del MLX. La segunda etapa de preformulación consistió en la incorporación de un segundo principio activo, AMX sódica, para obtener las formulaciones finales *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*. Estas dos formulaciones últimas cumplieron con las pruebas de reconstitución ya que se disolvieron de forma instantánea formando una solución de color amarillo transparente. Los rendimientos cumplieron con las especificaciones y por último el pH descendió alcanzando los valores cercanos a pH 8,0.

**Tabla 6.9.** Prueba de reconstitución, aspecto de la disolución reconstituida, riqueza y pH de las formulaciones preparadas en la segunda etapa del estudio de preformulación

Formulación	Prueba de reconstitución	Aspecto de la disolución reconstituida	Riqueza de MLX (%) $\pm$ DS	Riqueza de AMX (%) $\pm$ DS	pH $\pm$ DS
<i>MLX:AMX:CD</i>	Disuelve rápidamente	Amarrillo transparente	100,03 $\pm$ 0,08	99,76 $\pm$ 0,85	8,103 $\pm$ 0,009
<i>MLX:AMX:Sacarina</i>	Disuelve rápidamente	Amarrillo transparente	101,0 $\pm$ 1,01	99,8 $\pm$ 0,98	8,207 $\pm$ 0,04

## 6.6. Discusión parcial

MLX ha demostrado tener una solubilidad pH-dependiente. La solubilidad de MLX ha aumentado notablemente hasta pH 9,8 y luego manifestó una disminución a pH 11,2 debido a un fenómeno de precipitación. Los excipientes que ayudan a aumentar la solubilidad de MLX son:

Tween<sup>®</sup> 80, sacarina sódica y HP- $\beta$ -CD debido a mecanismos de formación de micelas del Tween<sup>®</sup> 80, formación de puentes de hidrógenos entre las moléculas



MLX y sacarina sódica y formación de los complejos de inclusión de ratio 1:1 con HP- $\beta$ -CD. Además, se modificó el tampón de pH 8,8 aumentando la concentración de glicina y se observó un incremento proporcional en el coeficiente de solubilidad del principio activo.

En la primera etapa de preformulación se obtuvieron diferentes formulaciones en los medios de pH 8,8 y 9,8, con los excipientes seleccionados. Finalmente, se obtuvieron las formulaciones finales al incorporar AMX sódica que es totalmente soluble en medio acuoso en tampón de pH 8,8 tanto con sacarina sódica como con HP- $\beta$ -CD. El pH obtenido de las formulaciones se disminuyó a los valores cercano a pH 8,0 debido a la naturaleza ácida de MLX.

## Bibliografía

- [1] A. T. Florence and D. Attwood, *Physicochemical Principles of Pharmacy*. London: Pharmaceutical Press, 4th ed., 2006.
- [2] H.-M. Ki and H.-K. Choi, "The effect of meloxicam/ethanolamine salt formation on percutaneous absorption of meloxicam.," *Archives of pharmacal research*, vol. 30, pp. 215–21, Feb. 2007.
- [3] S. H. Yalkowsky, *Techniques of solubilization of drugs*. New York: M. Dekker, 1981.
- [4] C. Subrahmanyam, *Essentials of Physical Pharmacy*. New Delhi: Vallabh Prakashan, 1st ed., 2003.
- [5] P. R. Babu, C. V. Subrahmanyam, J. Thimmasetty, R. Manavalan, and K. Valliappan, "Solubility of Meloxicam in Mixed Solvent Systems," *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, vol. 25, pp. 23–28, Oct. 2007.
- [6] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press, 2006.
- [7] N. Seedher and J. Kaur, "Solubilization Of Nimesulide; Use Of Co-Solvents," Jan. 2003.
- [8] R. Banerjee, P. M. Bhatt, N. V. Ravindra, and G. R. Desiraju, "Saccharin Salts of Active Pharmaceutical Ingredients, Their Crystal Structures, and Increased Water Solubilities," *Crystal Growth & Design*, vol. 5, pp. 2299–2309, Nov. 2005.

- [9] Y. Arcand, J. Hawari, and S. R. Guiot, "Solubility of pentachlorophenol in aqueous solutions: The pH effect," *Water Research*, vol. 29, pp. 131–136, Jan. 1995.
- [10] A. Y. Tinwalla, B. L. Hoesterey, T. X. Xiang, K. Lim, and B. D. Anderson, "Solubilization of thiazolobenzimidazole using a combination of pH adjustment and complexation with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin.," *Pharmaceutical research*, vol. 10, pp. 1136–43, Aug. 1993.
- [11] P. Li, S. E. Tabibi, and S. H. Yalkowsky, "Combined effect of complexation and pH on solubilization.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 87, pp. 1535–7, Dec. 1998.
- [12] S. Tommasini, M. L. Calabrò, D. Raneri, P. Ficarra, and R. Ficarra, "Combined effect of pH and polysorbates with cyclodextrins on solubilization of naringenin.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 36, pp. 327–33, Oct. 2004.
- [13] T. Higuchi and K. Connors, "Phase-solubility techniques," *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, vol. 4, pp. 117–212, 1965.
- [14] T. Loftsson and M. E. Brewster, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 85, pp. 1017–25, Oct. 1996.
- [15] G. Gladys, G. Claudia, and L. Marcela, "The effect of pH and triethanolamine on sulfisoxazole complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin.," *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, vol. 20, pp. 285–93, Nov. 2003.
- [16] R. G. Strickley, "Solubilizing excipients in oral and injectable formulations.," *Pharmaceutical research*, vol. 21, pp. 201–30, Feb. 2004.



## Capítulo 7

# Caracterización físico-química de las formulaciones seleccionadas por las técnicas instrumentales

Una vez obtenidos los liofilizados, se ha llevado a cabo una comparación, entre ellos, mediante las siguientes pruebas: reconstitución, determinación de la riqueza y pH, ya explicadas en el capítulo anterior.

Las formulaciones seleccionadas en la primera etapa han sido MLX:CD y MLX:Sacarina. Tras la incorporación de AXM en las formulaciones mencionadas anteriormente, se obtuvieron las formulaciones finales *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*. Todas estas formulaciones han cumplido con las especificaciones de las pruebas de caracterización física mencionadas. No obstante, su análisis y comparación puede realizarse recurriendo a diferentes técnicas analíticas como, por ejemplo: calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (XRD) espectrofotometría Infrarroja (IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM) ya que son útiles en el estudio de productos con características sólidas.

En este capítulo, se estudian las características físicas de las formulaciones mediante las técnicas analíticas siguientes:

- **IR:** se trata de una técnica que tiene dos aplicaciones principales en la caracterización de diversas moléculas: la determinación de la identidad de un compuesto por comparación de su espectro con el de una muestra conocida y la verificación de la presencia de grupos funcionales en una molécula desconocida, así que la utilización de este método instrumental para los sólidos formados después de la liofilización puede aclarar la interacción entre el fármaco y los excipientes. Con el fin de observar la interacción de los excipientes utilizados

para solubilizar el MLX, se estudiaron las formulaciones que contienen sólo el MLX que son MLX:CD y MLX:Sacarina.

- **XRD**: se utiliza para estudiar la cristalinidad de los liofilizados ya que el espectro de rayos X es la huella digital de cualquier compuesto al estado sólido. Se realiza para observar si las sustancias son amorfas o cristalinas. En nuestro trabajo, se determinan la cristalinidad de las dos formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* finales mediante la comparación de los espectros IR de las materias primas, sus correspondientes mezclas físicas y las formulaciones.
- **SEM**: esta técnica permite evaluar la apariencia, morfología y tamaño de las estructuras originadas en las distintas formulaciones liofilizadas. Se estudiaron las microfotografías de las materias primas, sus correspondientes mezclas físicas y las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*.

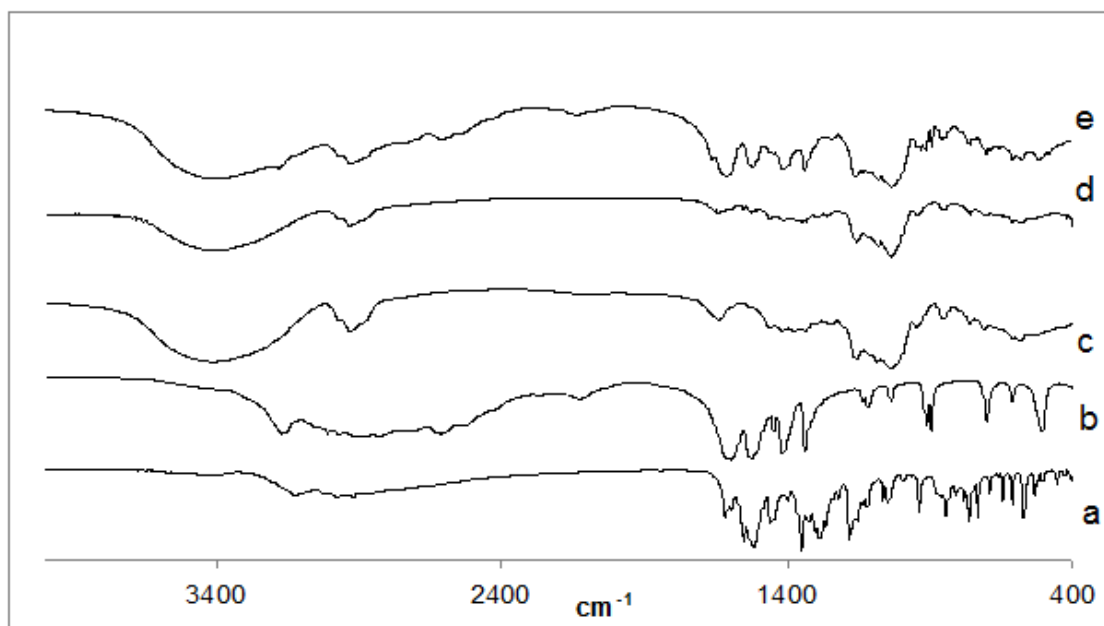
## 7.1. Caracterización de liofilizados por IR

Los espectros de absorción en el infrarrojo de MLX materia prima, glicina materia prima, HP- $\beta$ -CD, su correspondiente mezcla física y la formulación MLX:CD se muestran en la figura 7.1, respectivamente.

El espectro de infrarrojo (IR) del MLX materia prima (Fig. 7.1.a y 7.2.a) presenta unas bandas características de vibración de tensión correspondientes a  $3116,45\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión del enlace N-H),  $1550,51\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión del enlace C=N) y a  $1180,24\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión del enlace S=O) [1].

El espectro de IR de HP- $\beta$ -CD (Fig. 7.1.c) mostró las siguientes bandas de absorción: a  $3413,44\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión de los grupos N-H y O-H, a  $2917,82\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de tensión de los grupos C-H y a  $1149,39\text{ cm}^{-1}$  y  $1060,67\text{ cm}^{-1}$  asignada a la vibración elástica simétrica y asimétrica de los grupos C=O [1]. En el espectro de la mezcla física (Fig. 7.1.d), se podían observar todavía las bandas características de la sustancia activa, si bien la intensidad de las mismas disminuyó notablemente en comparación con el espectro de MLX materia prima, debido a la superposición de las bandas de la HP- $\beta$ -CD. Sin embargo, en el espectro IR de la formulación MLX:CD (Fig. 7.1.e), una de las bandas específicas de la sustancia activa, correspondiente a la vibración elástica de los grupos carbonilo a  $1612,22\text{ cm}^{-1}$  se desplazó y disminuyó de intensidad. Además, no se detectó la vibración de tensión atribuida a los grupos amida, indicando la existencia

de una fuerte interacción entre MLX y la HP- $\beta$ -CD. Probablemente, estos cambios tan drásticos fueron debidos a la formación de puentes de hidrógeno entre la molécula hospedadora (HP- $\beta$ -CD) y la huésped (MLX) [1]. Asimismo, cuando el grupo carbonilo entra a formar parte de un puente de hidrógeno, su banda se desplaza a una frecuencia menor debido al debilitamiento de su doble enlace. Estos fenómenos también indican que la vibración de la molécula huésped está restringida debido a la formación de un complejo de inclusión.

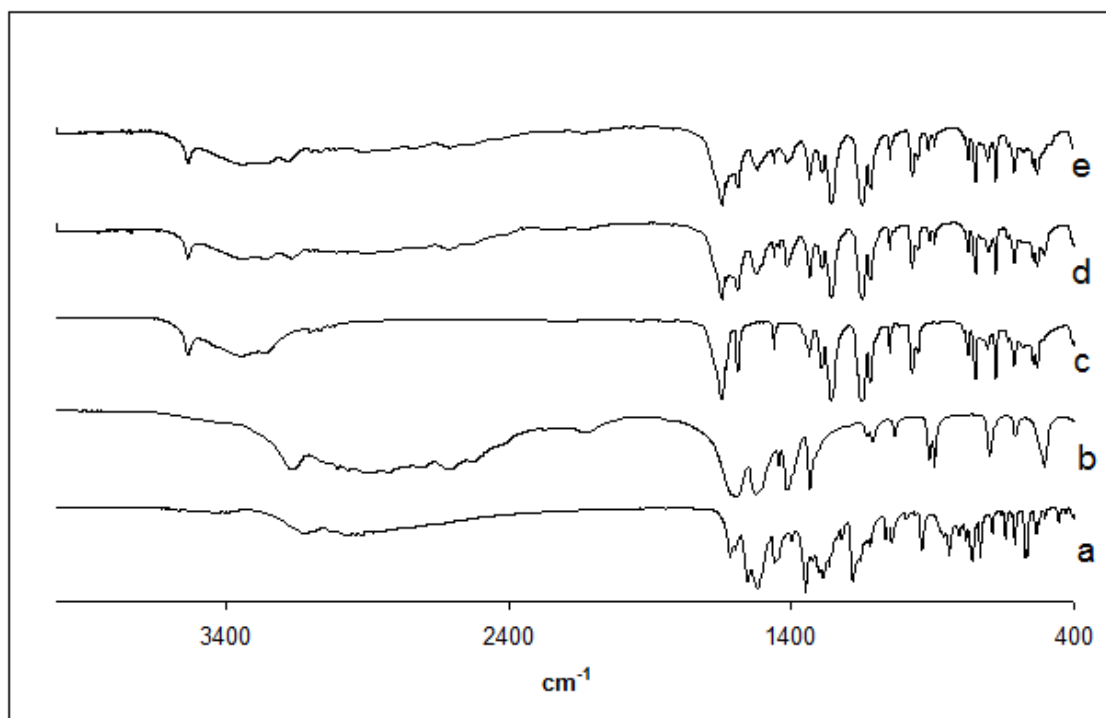


**Figura 7.1.** Espectro IR de MLX materia prima (a), glicina (b), HP- $\beta$ -CD (c), mezcla física correspondiente (d), formulación MLX:CD (e).

En la figura 7.2 se representan los siguientes espectros de absorción en el infrarrojo: MLX materia prima (a), glicina (b), sacarina sódica (c), su mezcla física correspondiente (d), la formulación MLX:Sacarina (e).

El espectro de la mezcla física (Fig. 7.2.d) fue equivalente a la adición de los espectros de MLX materia prima y excipientes (sacarina sódica y glicina) indicando que no había interacciones entre el principio activo y los solubilizantes. El espectro de la formulación MLX:Sacarina (ver Fig. 7.2.e) mostró un descenso significativo en la intensidad de las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los enlaces N-H y S=O de la sustancia activa, un ligero desplazamiento de la señal asignada a la vibración de tensión del enlace C=N y un pico característico de los enlaces C-O a  $3415,0\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de la sacarina sódica y de la glicina. Estos resultados permiten considerar que posiblemente se hayan formado interacciones

entre los grupos N-H y C=N del MLX, y los C=O de la glicina. En la región de baja frecuencia del espectro de la formulación liofilizada MLX:Sacarina ( $1000-400\text{ cm}^{-1}$ ), no hubo cambios en los picos característicos de MLX, indicando que no hay modificaciones en la simetría general de la molécula a pesar de estar unida por puentes de hidrógeno a la glicina. Similares interacciones fueron observadas por VijayaKumar et al. [2] en dispersiones sólidas de MLX y polietilen glicol 6000.



**Figura 7.2.** Espectro IR de MLX materia prima (a), glicina (b), sacarina sódica (c), mezcla física correspondiente (d), formulación MLX:Sacarina (e).

En conclusión, a través de los estudios de IR explicados anteriormente, se evidenciaron la existencia de interacciones de carácter no covalente entre los distintos excipientes usados en las formulaciones tales como 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sacarina sódica y glicina con el MLX, gracias a estas interacciones el MLX se solubiliza mejor en los medios seleccionados.

## 7.2. Caracterización de liofilizados por XRD

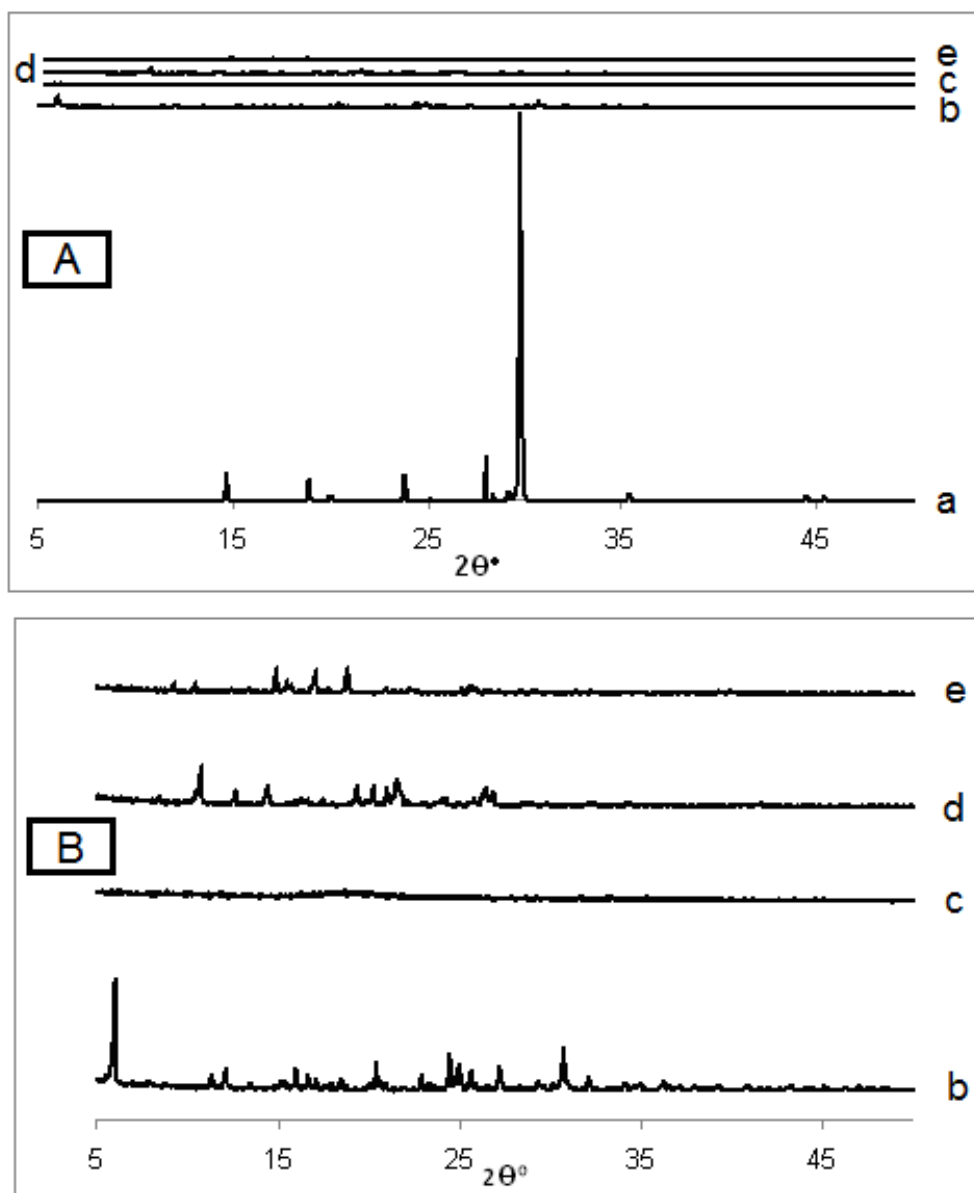
En estos estudios se evaluará la cristalinidad de las sustancias activas y de las formulaciones seleccionadas *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*.

En primer lugar, en la figura 7.3, se estudia la estructura cristalina de las muestras de materia prima a partir de las cuales se formulan los liofilizados, tales como glicina (a), sacarina sódica (b), HP- $\beta$ -CD (c), MLX (d) y AMX (e).

En el difractograma de glicina materia prima se encuentra bastantes picos de alta intensidad. Al rango de ángulos ( $2\theta$ )  $29,74^\circ$ , la intensidad alcanza un máximo de valor 21193. Por lo tanto se ha demostrado que este compuesto es especialmente cristalino y con cristales de gran tamaño [3].

La ampliación de los difractogramas (ver Fig. 7.3.B.) permite observar que la sacarina sódica, MLX y AMX materias primas también son cristalinos porque sus espectros de difracción muestran picos agudos con diferentes intensidad en el rango de ángulos ( $2\theta$ ) de  $5^\circ$  a  $30^\circ$ . Al rango de ángulo ( $2\theta$ )  $6,2^\circ$ , la intensidad alcanza un máximo de 730 demostrando la naturaleza cristalina de este compuesto [4]. Para MLX, el espectro de difracción muestra muchos picos con diferentes intensidades en el rango de ángulo de  $10^\circ$  a  $27^\circ$  cuyo el pico de máxima intensidad es  $2\theta$  de  $10,82^\circ$  con una intensidad de 268, por eso demostró que también MLX es cristalino [5, 6, 7]. La materia prima de AMX presenta los picos agudos característicos de alta intensidad en el rango de ángulo  $2\theta$  de  $14,94^\circ$ ,  $17,1^\circ$  y  $18,86^\circ$ , demostrando su forma cristalina [8]. Mientras, el difractograma correspondiente a HP- $\beta$ -CD presenta un halo característico de las sustancias amorfas [2].

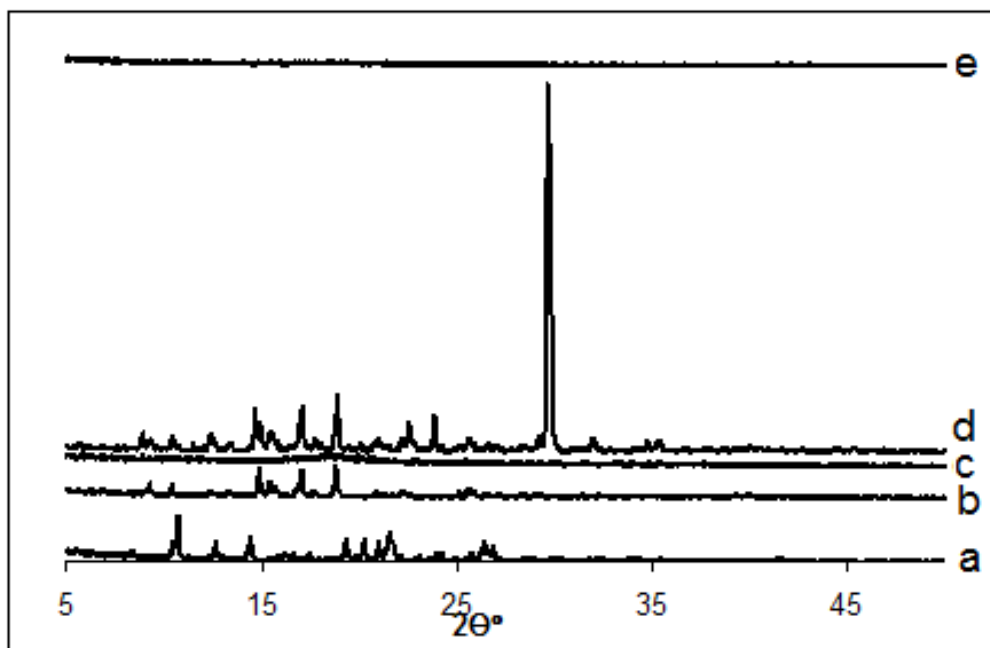




**Figura 7.3.** Difractogramas: A: Difractogramas de glicina (a), sacarina sódica (b), HP- $\beta$ -CD (c), MLX materia prima (d), AMX materia prima (e). B: Ampliación de difractogramas de b, c, d, e.

Respecto a la formulación *MLX:AMX:CD*, se comparan el espectro de difracción de ésta con los de las materias primas y su correspondiente mezcla física (Fig. 7.4.). El difratograma de la mezcla física tiene los picos agudos que coinciden con los picos de las materias primas pero con una intensidad más baja. El pico con máxima intensidad a ( $2\theta$ ) de 2738, correspondiente al pico de glicina materia prima. También, se observan los picos en la mezcla física correspondientes a los de las sustancias activas, indicando que la mezcla física es la suma de los componentes [9]. Sin embargo, la

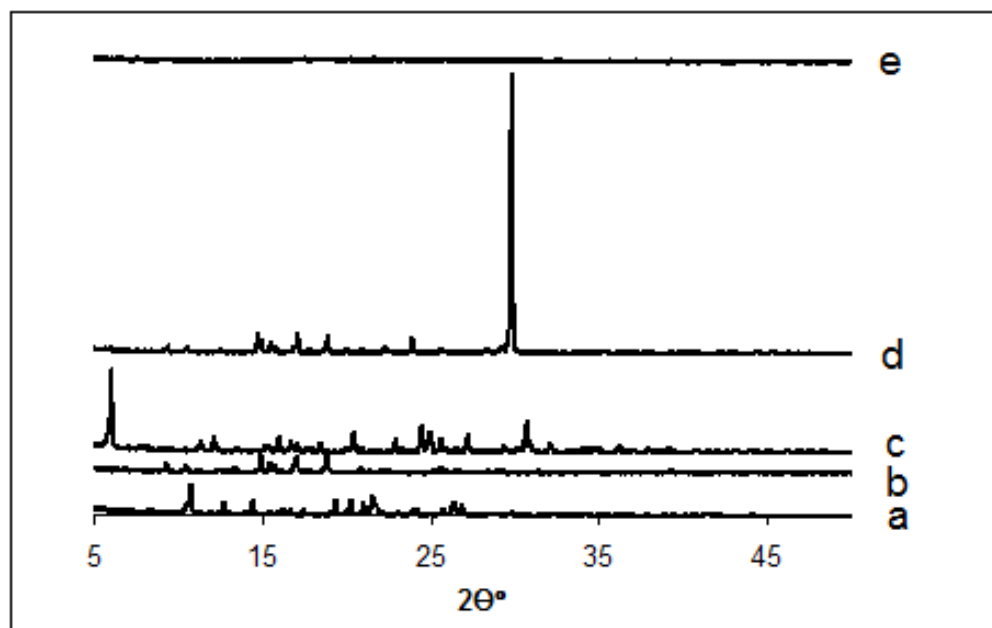
formulación estudiada *MLX:AMX:CD* demuestra ser amorfa debido a su espectro de difracción plano. Debido a esta característica amorfa la formulación se disuelve totalmente en medio tamponado, y posiblemente da lugar a la formación de los complejos de inclusión entre MLX y HP- $\beta$ -CD.



**Figura 7.4.** Difratogramas de MLX (a), AMX (b), HP- $\beta$ -CD (c), la mezcla física de MLX, AMX,HP- $\beta$ -CD, glicina a la misma proporción de la formulación (d), formulación *MLX:AMX:CD* (e)

En la figura 7.5 se representan los difractogramas siguientes: MLX materia prima (a), AMX materia prima (b), Sacarina sódica (c), mezcla física de MLX, AMX, glicina y sacarina sódica en las mismas proporciones que en la formulación *MLX:AMX:Sacarina* (d) y la misma formulación (e). Igualmente, el espectro de difracción de la mezcla física es la suma de los componentes de la formulación. No obstante, el espectro de difracción de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* muestra un halo plano demostrando así su naturaleza amorfa. El resultado de esta pérdida de cristalinidad posiblemente es debido al proceso de preparación de la formulación y su posterior liofilización.

En conclusión, a través de los estudios de XRD se ha demostrado que partiendo de sustancias de origen cristalino, mediante el proceso de elaboración y el uso de los excipientes adecuados, las formulaciones obtenidas son polvos liofilizados con características fundamentalmente amorfas. De esta forma se logra una rápida disolución



**Figura 7.5.** Difractogramas de MLX (a), AMX (b), Sacarina sódica (c), mezcla física correspondiente (d), y formulación *MLX:AMX:Sacarina*(e)

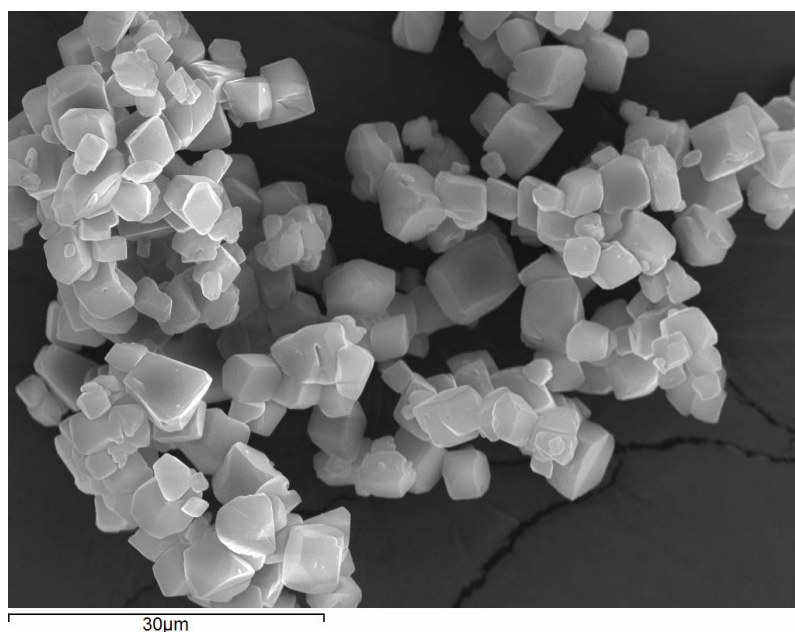
de los liofilizados [10, 11].

### 7.3. Caracterización de liofilizados por SEM

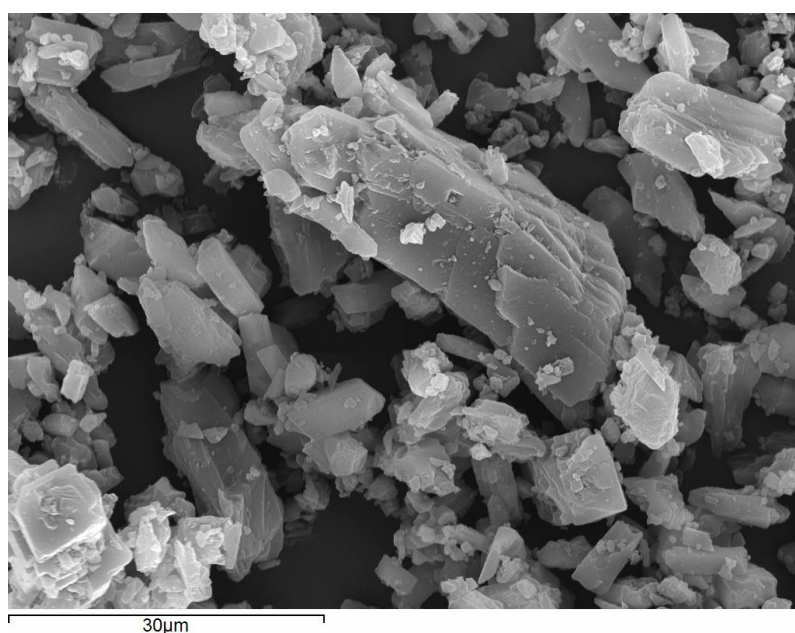
Se realiza un estudio morfológico de las sustancias activas, sus mezclas físicas correspondientes a las formulaciones y las formulaciones a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las fotografías obtenidas se muestran a continuación.

En la figura 7.6 se puede observar que los cristales de MLX poseen una estructura cristalina de forma cúbica [12, 13].

En la figura 7.7, la estructura cristalina de la AMX son cristales irregulares de forma plana [14, 15]. Estos resultados son lógicos, ya que los resultados obtenidos en XRD mostraron que tanto MLX y AMX se presentan en forma cristalina.

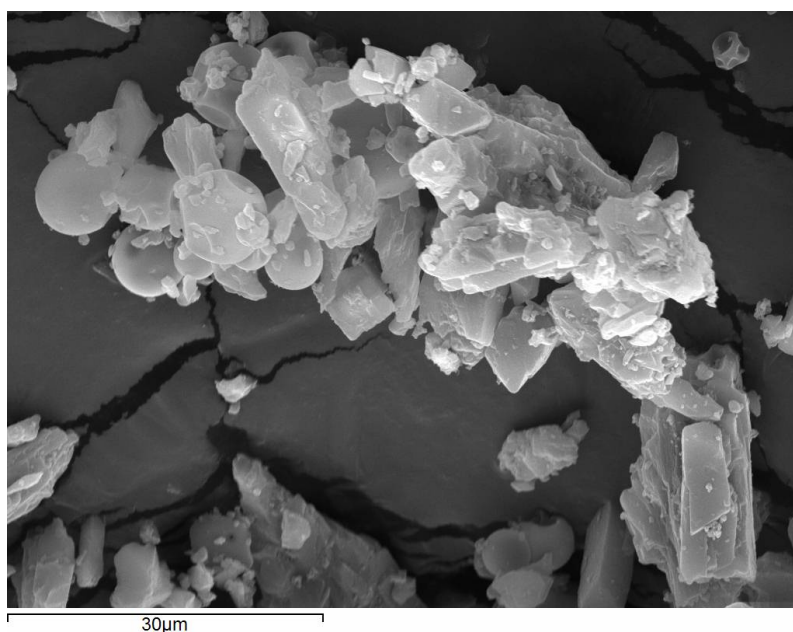


**Figura 7.6.** Microfotografía de los cristales de MLX, X 1500 aumentos

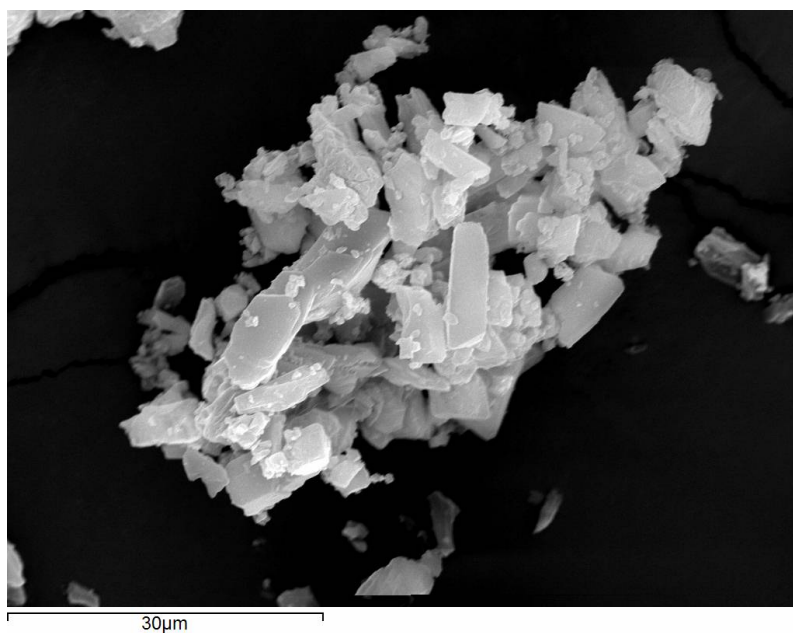


**Figura 7.7.** Microfotografía de los cristales de AMX, X 1500 aumentos

A continuación, se muestran las imágenes de las mezclas físicas de las formulaciones en las figuras 7.8 y 7.9. Se demuestra que en las mezclas físicas tanto las sustancias activas como sus excipientes siguen manteniendo su morfología. Los cristales del MLX y AMX se distribuyeron uniformemente y finamente en la superficie de las partículas más grandes de los excipientes.



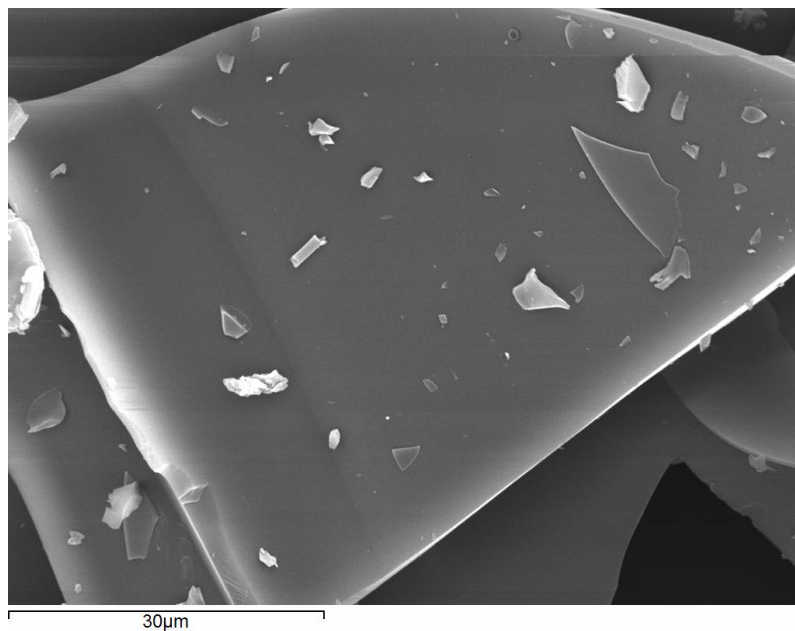
**Figura 7.8.** Microfotografía de la mezcla física de formulación *MLX:AMX:CD*, x 1500 aumento



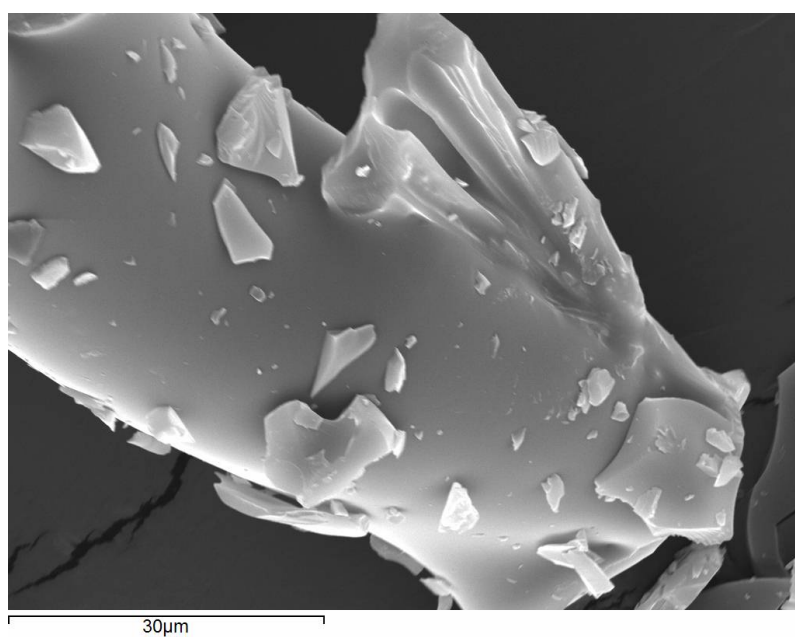
**Figura 7.9.** Microfotografía de la mezcla física de formulación *MLX:AMX:Sacarina*, x 1500 aumento

Las figuras 7.10 y 7.11. muestran la morfología de las formulaciones seleccionadas. Se observa que se producen cambios drásticos en la morfología de los liofilizados obtenidos, donde ya no es posible distinguir entre AMX, MLX y los excipientes.

Después de la liofilización, se observan estructuras fundamentalmente planas con ciertas escamas en la superficie, características de las sustancias amorfas [16].



**Figura 7.10.** Microfotografía de estructura de liofilizado de formulaciones *MLX:AMX:CD*, x 1500 aumento.



**Figura 7.11.** Microfotografía de estructura de liofilizado de formulación *MLX:AMX:Sacarina*, x 1500 aumento.

## 7.4. Discusión parcial

Los estudios de IR sobre las formulaciones de MLX evidenciaron la existencia entre los distintos excipientes y MLX la formación de complejos de inclusión con HP- $\beta$ -CD (en caso de la formulación MLX:CD) y la formación de puentes de hidrógeno con sacarina sódica (en caso de la formulación MLX:Sacarina). Estas interacciones ayudaron a solubilizar el MLX que es poco soluble en medio acuoso.

El estudio de difracción de rayos X muestra que las formulaciones finales son de estructura amorfa, lo cual facilita su solubilización, de ahí que puedan cumplir con la prueba de reconstitución.

Los estudios de SEM demuestran que después de la liofilización se obtuvieron unas estructuras fundamentalmente planas, propias de las sustancias amorfas, de acuerdo con los resultados obtenidos por XRD.

## Bibliografía

- [1] H. A. EL-MARADNY, S. A. MORTADA, O. A. KAMEL, and A. H. HIKAL, "Characterization of ternary complexes of meloxicam-HP $\beta$ CD and PVP or L-arginine prepared by the spray-drying technique," *Acta pharmaceutica*, vol. 58, no. 4, pp. 455–466, 2008.
- [2] S. G. Vijaya Kumar and D. N. Mishra, "Preparation, characterization and in vitro dissolution studies of solid dispersion of meloxicam with PEG 6000.," *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, vol. 126, pp. 657–64, Aug. 2006.
- [3] D. B. Varshney, S. Kumar, E. Y. Shalaev, P. Sundaramurthi, S.-W. Kang, L. A. Gatlin, and R. Suryanarayanan, "Glycine crystallization in frozen and freeze-dried systems: effect of pH and buffer concentration.," *Pharmaceutical research*, vol. 24, pp. 593–604, Mar. 2007.
- [4] C. B. Romañuk, R. H. Manzo, Y. G. Linck, A. K. Chattah, G. A. Monti, and M. E. Olivera, "Characterization of the solubility and solid-state properties of saccharin salts of fluoroquinolones.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 98, pp. 3788–801, Oct. 2009.

- [5] M. M. Ghareeb, A. A. Abdulrasool, A. A. Hussein, and M. I. Noordin, “Kneading technique for preparation of binary solid dispersion of meloxicam with poloxamer 188,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, pp. 1206–15, Jan. 2009.
- [6] S. K. Jain, Y. Gupta, A. Jain, and S. Amin, “Elastic liposomes bearing meloxicam-beta-cyclodextrin for transdermal delivery,” *Current drug delivery*, vol. 5, pp. 207–14, July 2008.
- [7] P. R. Nassab, R. Rajkó, and P. Szabó-Révész, “Physicochemical characterization of meloxicam-mannitol binary systems,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 41, pp. 1191–7, June 2006.
- [8] K. Songsurang, J. Pakdeebumrung, N. Praphairaksit, and N. Muangsin, “Sustained release of amoxicillin from ethyl cellulose-coated amoxicillin/chitosan-cyclodextrin-based tablets,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, pp. 35–45, Mar. 2011.
- [9] A. A. Ambike, K. R. Mahadik, and A. Paradkar, “Stability study of amorphous valdecoxib,” *International journal of pharmaceutics*, vol. 282, pp. 151–62, Sept. 2004.
- [10] N. Elgindy, K. Elkhodairy, A. Molokhia, and A. Elzoghby, “Lyophilization monophasic solution technique for improvement of the physicochemical properties of an anticancer drug, flutamide,” *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, vol. 74, pp. 397–405, Feb. 2010.
- [11] Z. Wang, Y. Deng, S. Sun, and X. Zhang, “Preparation of hydrophobic drugs cyclodextrin complex by lyophilization monophasic solution,” *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 32, pp. 73–83, Jan. 2006.
- [12] A. Pomázi, R. Ambrus, P. Sipos, and P. Szabó-Révész, “Analysis of co-spray-dried meloxicam-mannitol systems containing crystalline microcomposites,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 56, pp. 183–90, Sept. 2011.
- [13] N. B. Naidu, K. P. R. Chowdary, K. V. R. Murthy, V. Satyanarayana, A. R. Hayman, and G. Becket, “Physicochemical characterization and dissolution pro-



- perties of meloxicam-cyclodextrin binary systems.,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 35, pp. 75–86, Apr. 2004.
- [14] J. K. Patel and J. R. Chavda, “Formulation and evaluation of stomach-specific amoxicillin-loaded carbopol-934P mucoadhesive microspheres for anti-*Helicobacter pylori* therapy.,” *Journal of microencapsulation*, vol. 26, pp. 365–76, June 2009.
- [15] Z. Liu, W. Lu, L. Qian, X. Zhang, P. Zeng, and J. Pan, “In vitro and in vivo studies on mucoadhesive microspheres of amoxicillin.,” *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 102, pp. 135–44, Jan. 2005.
- [16] G. Nichols, “Applications of cathodoluminescence spectroscopy and imaging in the characterisation of pharmaceutical materials.,” *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, pp. 19–42, Jan. 2012.

## Capítulo 8

# Estudio de inocuidad *in vitro* de las formulaciones seleccionadas

La inocuidad *in vitro* de las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* fue estudiada mediante las pruebas de determinación el potencial de hemólisis y de precipitación.

Debido a la poca solubilidad de MLX en agua, las formulaciones se obtuvieron mediante la disolución de MLX en un tampón de glicinia/NaOH a pH 8,8 con los siguientes excipientes: hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP $\beta$ CD) (formulación *MLX:AMX:CD*) y sacarina sódica (formulación *MLX:AMX:Sacarina*). Tanto las sustancias activas como los excipientes usados pueden causar efecto hemolítico [1]. Sin embargo, AMX ha demostrado ser hemocompatible no causando ningún efecto hemolítico [2]. Stei y col. [1] ha demostrado que la disolución de MLX 15 mg/ 1,5 ml para el uso parenteral presentó un grado de hemólisis menor de 2 %, mientras los otros AINEs, tales como Piroxicam, Ketoprofen, Indometacina, Diclofenaco, Ibuprofen presentaron un grado de hemólisis mayores de 10 %. El estudio demostró que el MLX no tiene efecto hemolítico revelante. Por otro lado, el uso de determinados aditivos en las formulaciones de uso parenteral implica un riesgo de lisis de los eritrocitos, y la consiguiente liberación de hemoglobina y otros componentes celulares al torrente sanguíneo. El aumento de hemoglobina libre en el plasma está asociado con muchas alteraciones clínicas indeseables como, por ejemplo la disfunción renal, y la esplenomegalia e ictericia [3, 4, 5, 6]. Por todo esto se debe realizar un estudio *in vitro* para observar el riesgo de hemólisis debida a la formulación. En este capítulo, se estudiaron el potencial de toxicidad hemolítica de las formulaciones según el método descrito en el apartado 4.3.6

Los problemas causados por la precipitación de fármaco en el sitio de inyección

incluyen dolor, reacciones inflamatorias y a veces hasta se reduce la biodisponibilidad del fármaco [7]. Varios métodos *in vitro* han sido desarrollados para estudiar la precipitación de las formulaciones parenterales, por ejemplo, el modelo de inyección dinámica por Yalkowsky y cols. [8] y el modelo de dilución serial estática desarrollado por Li y cols. [9]. En el método dinámico, la formulación es añadida a un tampón o a un fluido de infusión a través de un inyector diseñado especialmente para ello, las velocidades de flujo de la formulación y del tampón deben ser ajustadas para simular la precipitación que ocurriría en el cuerpo del animal. Los resultados obtenidos por este método han demostrado estar relacionados con el resultado en las pruebas realizadas en animales [10].

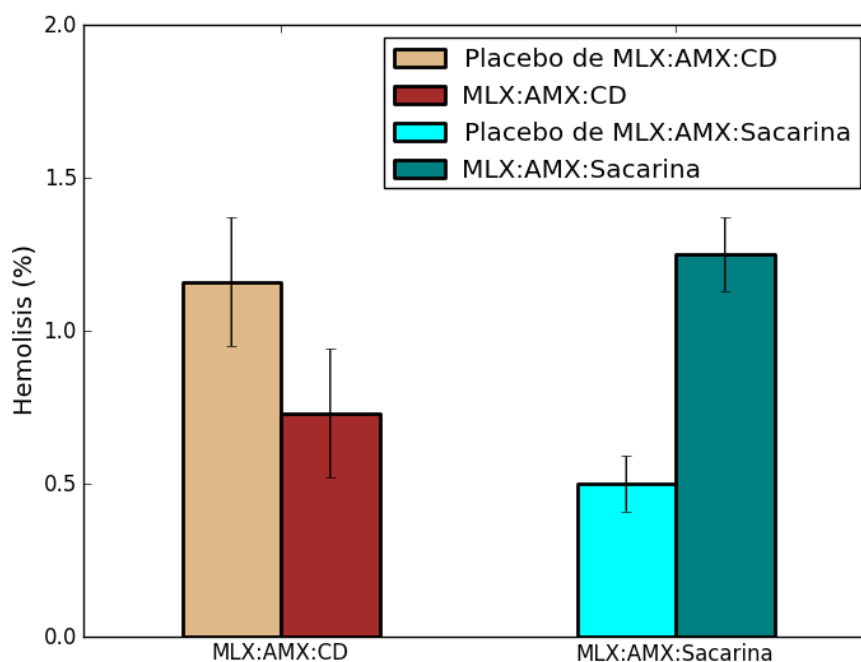
El método estático es efectivo para determinar el potencial de precipitación, cantidad y tiempo de duración en la aparición de los cristales en soluciones que se encuentran super-saturadas [11]. En este capítulo, se determinaron el potencial de precipitación de las formulaciones seleccionadas por el método de dilución serial estática.

### 8.1. Estudio hemolítico *in vitro* de las formulaciones seleccionadas

El ensayo de hemólisis *in vitro* es una medida simple y fiable que se utiliza para observar el daño que se puede producir en la membrana celular [12, 13]. Por lo tanto, se realizó este ensayo *in vitro* con las formulaciones de MLX y AMX, con el fin de observar su inocuidad de cara a ser utilizadas *in vivo*

Los factores de interés en un estudio de hemólisis *in vitro* son el ratio de la formulación: sangre y el tiempo de contacto de los mismos antes de ser diluida para no causar hemólisis [14]. Para asegurar la seguridad de las formulaciones obtenidas, se realizaron los estudios de hemólisis con un ratio de formulación: sangre (1:1) y un tiempo de contacto de 1 hora en agitación. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8.1 como se puede observar tanto los placebos como las formulaciones tienen una insignificante actividad hemolítica ya que el porcentaje de hemólisis es inferior de 2%. Según Krzynzaniak J.F [15], cuando  $H(\%) < 10\%$ , no se produce efecto hemolítico *in vivo*. Además, la formulación *MLX:AMX:CD* tiene un efecto hemolítico de 0,73%, incluso inferior que el del placebo. Esto se debe a que en el placebo las ciclodextrinas están en su forma libre por lo tanto el placebo resulta más hemolítico que la formulación donde las ciclodextrinas forman los complejo de

inclusión con el MLX [16].



**Figura 8.1.** Resultado del estudio hemolítico *in vitro*

## 8.2. Estudio de precipitación *in vitro* de las formulaciones seleccionadas

MLX presenta una solubilidad de saturación de 0,701 mg/ml a pH 7,4. La dosis de MLX en las formulaciones es 5,0 mg/ml gracias a los excipientes usados en el medio de pH 8,8. Después de la administración i.m. de las formulaciones, los excipientes y el tampón pH 8,8 se diluyen hasta la condición fisiológica a pH 7,4. Por lo tanto podría existir un riesgo de precipitación de las formulaciones desarrolladas.

En el estudio de precipitación *in vitro*, las soluciones reconstituidas de las formulaciones seleccionadas fueron diluidas en el tampón PBS de la siguiente forma: 1/1024, por lo tanto la composición original de todos los componentes de la formación también se reduce: la concentración de MLX, glicina, ciclodextrina y sacarina sódica disminuyen a la proporción de dilución realizada. Se busca que tanto el pH, como la tonicidad de la formulación alcancen el valor del tampón PBS. La precipitación de la formulación fue realizada mediante observación visual de dos analistas individuales. La tabla 8.1 muestra la presencia o ausencia de precipitados durante las diluciones realizadas a diferentes tiempos. El resultado demostró que no aparece

precipitación en ninguna de las diluciones realizadas.

**Tabla 8.1.** Presencia (+) o ausencia (-) de precipitación en las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*

Relación de dilución en PBS	<i>MLX:AMX:CD</i>				<i>MLX:AMX:Sacarina</i>			
	Tiempo (min)				Tiempo (min)			
	0	10	30	60	0	10	30	60
1	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
0,125	-	-	-	-	-	-	-	-
0,063	-	-	-	-	-	-	-	-
0,031	-	-	-	-	-	-	-	-
0,016	-	-	-	-	-	-	-	-
0,008	-	-	-	-	-	-	-	-
0,004	-	-	-	-	-	-	-	-
0,002	-	-	-	-	-	-	-	-

Los resultados obtenidos mediante determinación espectrofotométrica confirman la ausencia de precipitación de MLX después de 24 horas en las distintas mezclas ya que las concentraciones medidas son iguales a las teóricas.

### 8.3. Discusión parcial

Mediante el estudio de hemólisis *in vitro*, se demostró que las formulaciones estudiadas no presentan ningún tipo de actividad hemolítica.

Mediante la prueba de precipitación *in vitro*, se demostró que los excipientes utilizados son capaces de solubilizar el MLX a pH neutro sin que se produzca ninguna precipitación.

### Bibliografía

- [1] P. Stei, B. Kruss, J. Wiegler, and V. Trach, "Local Tissue Tolerability of Meloxicam, a New NSAID: Indications for Parenteral, Dermal and Mucosal Administration," *Rheumatology*, vol. 35, pp. 44–50, Apr. 1996.

- [2] M. Senturk, O. I. Kufrevioglu, and M. Ciftci, "Effects of some antibiotics on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study.," *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, vol. 23, pp. 144–8, Feb. 2008.
- [3] J. F. Krzyzaniak, F. A. Alvarez Núñez, D. M. Raymond, and S. H. Yalkowsky, "Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 86, pp. 1215–7, Nov. 1997.
- [4] S. Brown, L. Templeton, D. A. Prater, and C. J. Potter, "Use of an in vitro haemolysis test to predict tissue irritancy in an intramuscular formulation.," *Journal of parenteral science and technology : a publication of the Parenteral Drug Association*, vol. 43, no. 3, pp. 117–20, 1989.
- [5] S. Oshida, K. Degawa, Y. Takahashi, and S. Akaishi, "Physico-chemical properties and local toxic effects of injectables.," *The Tohoku journal of experimental medicine*, vol. 127, pp. 301–16, Apr. 1979.
- [6] C. Surber and U. C. Dubach, "Tests for local toxicity of intramuscular drug preparations. Comparison of in vivo and in vitro findings.," *Arzneimittel-Forschung*, vol. 39, pp. 1586–9, Dec. 1989.
- [7] S. H. Yalkowsky, J. F. Krzyzaniak, and G. H. Ward, "Formulation-related problems associated with intravenous drug delivery.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 87, pp. 787–96, July 1998.
- [8] S. H. Yalkowsky, S. C. Valvani, and B. W. Johnson, "In vitro method for detecting precipitation of parenteral formulations after injection.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 72, pp. 1014–7, Sept. 1983.
- [9] P. Li, R. Vishnuvajjala, S. E. Tabibi, and S. H. Yalkowsky, "Evaluation of in vitro precipitation methods.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 87, pp. 196–9, Feb. 1998.
- [10] J. L. H. Johnson, Y. He, and S. H. Yalkowsky, "Prediction of precipitation-induced phlebitis: a statistical validation of an in vitro model.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 92, pp. 1574–81, Aug. 2003.
- [11] F. A. Alvarez-Núñez and S. H. Yalkowsky, "Buffer capacity and precipitation control of pH solubilized phenytoin formulations.," *International journal of pharmaceutics*, vol. 185, pp. 45–9, Aug. 1999.

- [12] W. J. Pape, U. Pfannenbecker, and U. Hoppe, "Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants.," *Molecular toxicology*, vol. 1, no. 4, pp. 525–36, 1988.
- [13] O. Reer, T. K. Bock, and B. W. Müller, "In vitro corneal permeability of diclofenac sodium in formulations containing cyclodextrins compared to the commercial product voltaren ophtha.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 83, pp. 1345–9, Sept. 1994.
- [14] G. A. Brazeau and H. L. Fung, "An in vitro model to evaluate muscle damage following intramuscular injections.," *Pharmaceutical research*, vol. 6, pp. 167–70, Feb. 1989.
- [15] J. F. Krzyzaniak, D. M. Raymond, and S. H. Yalkowsky, "Lysis of human red blood cells 2: effect of contact time on cosolvent induced hemolysis," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 152, pp. 193–200, June 1997.
- [16] T. Irie and K. Uekama, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 86, pp. 147–62, Feb. 1997.

## Capítulo 9

# Estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas

Los estudios farmacocinéticos permiten conocer la evolución temporal de las concentraciones de fármacos en el interior del organismo. Se realizó un estudio comparativo del comportamiento farmacocinético de las formulaciones seleccionadas tras de la administración intramuscular de dosis únicas de MLX y AMX, en animales de experimentación.

Las formulaciones empleadas para este estudio fueron *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*. La disolución control utilizada en este estudio fue la disolución de MLX y AMX a la concentración 0,05 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente, en suero fisiológico ya que no existen inyectables parecidos a las formulaciones en el mercado.

Los estudios realizados con ratones se realizaron en el departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia, UCM, que cumple con los requerimientos legislativos relativos a las experimentaciones en animales.

Las condiciones del trabajo son las siguientes:

- Animales de experimentación: Se emplearon como animales de experimentación, ratones CD-1, de un peso aproximadamente de 30-35 gramos. Para las muestras plasmáticas de cada tiempo de análisis se utilizaron 6 ratones.
- Dosis de fármacos administradas: Se administraron por vía i.m. las dosis de MLX y AMX recomendadas para la formulación comercial de MLX y la formulación comercial de AMX (0,5 y 10 mg/kg, respectivamente). Para la preparación de las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*, se diluyeron las cantidades correspondiente de los liofilizados en suero fisiológico. Para la



preparación de la disolución control, se disolvieron 10 mg de MLX y 200 mg de AMX en 200 ml también en suero fisiológico obteniendo las concentraciones deseadas.

- Extracción y análisis de las muestras: Se tomaron muestras plasmáticas heparinizadas a los 5, 15, 60, 90 y 120 min tras la administración de MLX y AMX. El tratamiento y análisis de las muestras plasmáticas se ha descrito en el capítulo 4 de esta tesis.

## 9.1. Resultados del estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas y de la disolución control tras su administración i.m

Los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético de MLX para cada una de las formulaciones seleccionadas aparecen reflejados en las tablas 9.1-9.3, y sus perfiles farmacocinéticos junto con los de la disolución control se muestran en la figura 9.1.

**Tabla 9.1.** Resultados del estudio farmacocinético de MLX en la disolución control tras su administración a una dosis de 0,5 mg/kg por vía i.m.

Tiempo (min)	Concentración (µg/ml)						Concentración media (µg/ml)±DS
	1	2	3	4	5	6	
5	3,601	3,835	3,664	3,210	2,586	2,532	3,238 ±0,565
15	2,928	2,446	2,061	1,974	2,287	3,263	2,493 ± 0.507
60	0,280	0,246	0,239	0,195	0,262		0,245 ± 0,032
90	0,207	0,219	0,248	0,214	0,233	0,226	0,225 ± 0,015
120	0,161	0,123	0,107	0,187	0,123	0,097	0,133 ± 0,034

Tras la administración i.m. de 0,5 mg/kg de MLX de la disolución control, se observó una absorción rápida (ver Fig. 9.1), la concentración máxima alcanzó valores de 3,238 µg/ml a los 5 minutos. Además, este fármaco mostró una cinética biexponencial con una primera fase de disminución rápida de los niveles plasmáticos, seguida de una segunda fase más lenta.

**Tabla 9.2.** Resultados del estudio farmacocinético de MLX en la formulación *MLX:AMX:CD* tras su administración a una dosis de 0,5 mg/kg i.m.

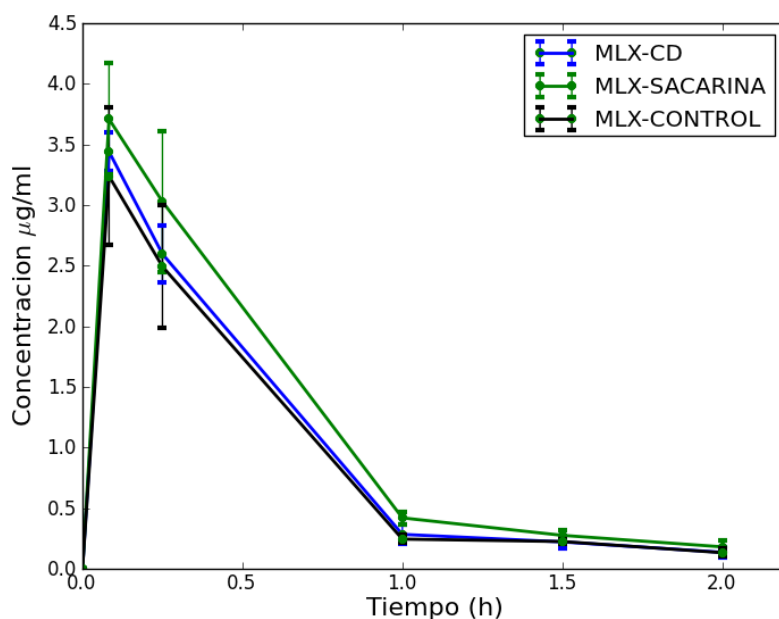
Tiempo (min)	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )						Concentración media ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ DS
	1	2	3	4	5	6	
5	3,683	3,418	3,326	3,549	3,221	3,442	3,440 $\pm$ 0,163
15	2,286	2,474	2,503	2,614	2,973	2,727	2,596 $\pm$ 0,236
60	0,383	0,307	0,229	0,363	0,180	0,242	0,284 $\pm$ 0,080
90	0,300	0,261	0,235	0,184	0,172	0,179	0,222 $\pm$ 0,052
120	0,082	0,131	0,188	0,099	0,144	0,170	0,136 $\pm$ 0,041

Con respecto a la formulación *MLX:AMX:CD*, también se observó una distribución rápida del fármaco en el torrente sanguíneo, ya que la concentración máxima alcanzada fue igual que la de la disolución control a los 5 min después de su administración. Además, se observó una cinética parecida a la del control con dos fases, una de disminución más rápida seguida por otra más lenta. Tras la administración i.m. a la dosis 0,5 mg/kg de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* se obtuvo la concentración plasmática más elevada, en comparación a las obtenidas por las otras formulaciones (3,709  $\mu\text{g/ml}$  a los 5 min), mostrando un perfil cinético semejante a los anteriores.

**Tabla 9.3.** Resultados del estudio farmacocinético de MLX en la formulación *MLX:AMX:Sacarina* tras su administración a una dosis de 0,5 mg/kg i.m.

Tiempo (min)	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )						Concentración media ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ DS
	1	2	3	4	5	6	
5	3,921	3,341	3,668	4,434	3,766	3,123	3,709 $\pm$ 0,459
15	3,791	2,394	2,903	2,511	3,668	2,899	3,028 $\pm$ 0,582
60	0,503	0,393	0,356	0,443	0,440	0,386	0,420 $\pm$ 0,053
90	0,300	0,327	0,259	0,276	0,281	0,212	0,276 $\pm$ 0,039
120	0,136	0,253	0,135	0,213	0,231	0,117	0,181 $\pm$ 0,058

## 9.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LAS FORMULACIONES SELECCIONADAS Y DE LA DISOLUCIÓN CONTROL TRAS SU ADMINISTRACIÓN I.M



**Figura 9.1.** Representaciones gráficas de los valores medios y desviaciones estándar de las concentraciones plasmáticas de MLX en las formulaciones *MLX:AMX:CD* , *MLX:AMX:Sacarina* y de la disolución control tras la administración i.m. de una dosis única de 0,5 mg/kg de principio activo

Como se puede observar, las formulaciones presentan un perfil muy semejante, variando tan sólo la concentración máxima obtenida, siendo superior para la formulación *MLX:AMX:Sacarina* (ver tablas ??-9.3).

A continuación, los resultados del estudio farmacocinético de AMX en la disolución control, y en las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* se detallan en las tablas 9.4-9.6 mostrándose sus perfiles farmacocinéticos en la figura 9.2.

**Tabla 9.4.** Resultados del estudio farmacocinético de AMX en la disolución control tras su administración a una dosis de 10 mg/kg i.m.

Tiempo (min)	Concentración (µg/ml)						Concentración media (µg/ml)±DS
	1	2	3	4	5	6	
5	15,694	9,871	17,405	8,619	11,586	13,614	12,798 ± 3,399
15	8,117	13,071	6,743	6,160	5,922	6,045	7,677 ± 2,764
60	6,027	6,135	5,840	5,543	7,536		6,216 ± 0,771
90	6,047	5,512	4,280	4,244	4,291	3,927	4,717 ± 0,851
120	3,802	4,019	1,518	2,708	3,693	2,105	2,974 ± 1,024

En la figura 9.2 con respecto a la disolución control, se observó que la absorción de AMX ocurrió inmediatamente, ya que la concentración máxima fue de 12,798  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a los 5 min, mostrando una cinética biexponencial con una primera fase de disminución rápida de concentraciones plasmáticas seguida de una segunda eliminación más lenta.

**Tabla 9.5.** Resultados del estudio farmacocinético de AMX en la formulación *MLX:AMX:CD* tras su administración a una dosis de 10 mg/kg i.m.

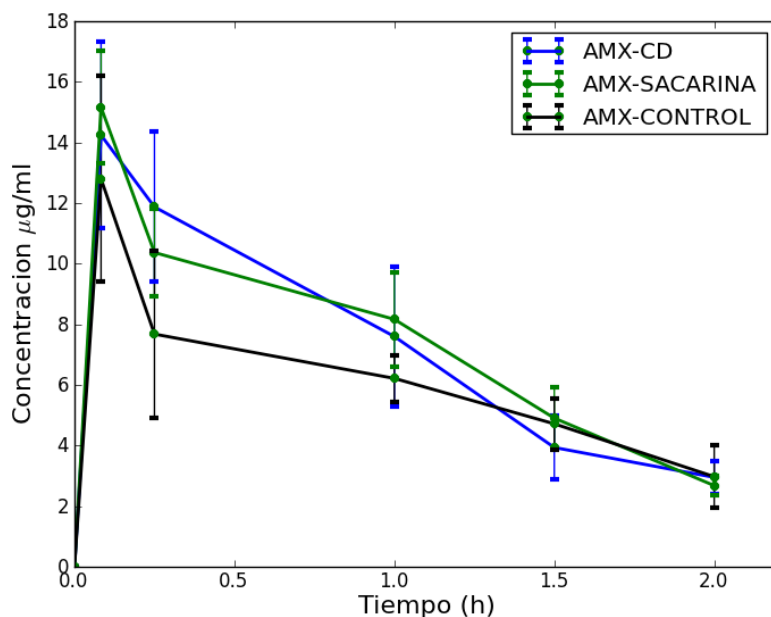
Tiempo (min)	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )						Concentración media ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) $\pm$ DS
	1	2	3	4	5	6	
5	11,313	10,911	16,453	18,957	13,873	13,934	14,240 $\pm$ 3,067
15	7,568	10,805	12,274	12,274	13,761	14,541	11,871 $\pm$ 2,477
60	5,825	6,986	7,117	7,454	12,147	6,060	7,598 $\pm$ 2,317
90	4,624	2,857	3,609	5,679	3,132	3,718	3,936 $\pm$ 1,047
120	2,696	3,973	2,711	2,508	2,637	3,184	2,951 $\pm$ 0,551

Los resultados de la tabla 9.5 muestran que la absorción de la formulación *MLX:AMX:CD* al torrente sanguíneo fue bastante rápida, alcanzando una concentración máxima de 14,240  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a los 5 min. Además, mostró una cinética biexponencial, semejante a la de la disolución control (ver Fig. 9.2).

La tabla 9.6 y la figura 9.2 recogen los resultados del estudio farmacocinético de AMX tras la administración de la formulación *MLX:AMX:Sacarina*. Se observa que con esta formulación se alcanzan las concentraciones plasmáticas más elevadas de fármaco: 15,158  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a los 5 min.

**Tabla 9.6.** Resultados del estudio farmacocinético de AMX de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* tras su administración a una dosis de 10 mg/kg i.m.

Tiempo (min)	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )						Concentración media ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) $\pm$ DS
	1	2	3	4	5	6	
5	16,131	13,102	16,288	16,662	16,294	12,472	15,158 $\pm$ 1,856
15	11,644	9,756	11,719	8,021	9,756	11,315	10,368 $\pm$ 1,457
60	7,028	7,788	7,144	9,315	10,775	6,932	8,164 $\pm$ 1,558
90	6,065	5,503	5,590	4,862	3,464	3,947	4,905 $\pm$ 1,017
120	2,684	3,046	2,298	2,509	3,077	2,463	2,679 $\pm$ 0,320



**Figura 9.2.** representaciones gráficas de los valores medios y desviaciones estandar de las concentraciones plasmáticas de AMX en las dos formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AXM:Sacarina* y de la disolución control tras la administración i.m. a una dosis única de 10 mg/kg

Los perfiles farmacocinéticos de AMX en las formulaciones seleccionadas (*MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*) y en la disolución control son similares. Aunque la evolución de la concentración de AMX frente al tiempo en la formulación *MLX:AMX:Sacarina* fue más semejante a la del control, presentando unas concentraciones plasmáticas más elevadas

## 9.2. Estudio de distintos parámetros farmacocinéticos y su análisis estadístico

Uno de los principios fundamentales de la farmacología es la relación en el tiempo que existe entre el efecto del fármaco y la cantidad del mismo en el lugar de acción. La cantidad de fármaco presente en el organismo está directamente relacionada con los procesos de absorción, distribución y eliminación del fármaco, y también con la naturaleza del principio activo y el régimen de dosificación empleado. Por lo tanto para evaluar los datos de concentración plasmáticas frente al tiempo se calcularon los siguientes parámetros:

$C_{max}$ : Concentración máxima.

$T_{max}$ : Tiempo en que se alcanza la concentración máxima.

$AUC_0^\infty$ : Área bajo la curva de niveles plasmáticos.

MRT: Tiempo medio de residencia

$T_{1/2\beta}$ : Semivida biológica en la fase terminal

Los resultados farmacocinéticos obtenidos aparecen reflejados en la tabla 9.7.

Se puede observar que la absorción de MLX y AMX fue rápida, a los 5 min se alcanzaron los máximos valores de concentración plásmatica debido a la forma de administración, al tratarse de una administración por vía i.m.. Asimismo, las formulaciones son disoluciones de naturaleza acuosa, por lo tanto no se forman depósitos en el tejido muscular, entrando de forma más rápida al torrente sanguíneo [1, 2].

Los valores de  $C_{max}$  y AUC de AMX fueron superiores a los presentados por MLX. Estos resultados pueden ser debidos a la naturaleza hidrófila de la AMX y también a que la dosis administrada de este fármaco fue 20 veces mayor que la de MLX. Sin embargo, los valores de RTM y  $T_{1/2\beta}$  de MLX son más prologados que los de AMX ya que se trata de una molécula que posee una semivida bastante retardada [3].

Los valores obtenidos de  $T_{1/2\beta}$  de AMX en la disolución control, formulación *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* fueron 56,3, 50,1 y 54,7 min, respectivamente. Estos valores son muy similares a los resultados obtenidos por Amparo Sánchez [4] en el estudio farmacocinético de AMX administrada por vía oral a una dosis de 500 mg.

Los valores de RTM de MLX en la disolución control, formulación *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* fueron 117,5, 117,3 y 129,7 min, respectivamente. Y los valores de  $T_{1/2\beta}$  de MLX en la disolución control, formulación *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* fueron 103,4, 100,7, 111,7 min, respectivamente. En el trabajo de Busch y col. [5], se consigieron unos valores parecidos de RTM de 180,7 min y  $T_{1/2\beta}$  de 210,8 min después de la administración intravenosa de una dosis de 10 mg/kg de MLX en ratones.

**Tabla 9.7.** Parámetros farmacocinéticos de MLX y AMX en diferentes formulaciones tras la administración i.m. de una única dosis de ambos fármacos (0,05 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente).

Parámetros	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{max}$ (min)	AUC( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )	RTM(min)	$T_{1/2\beta}$ (min)
AMX					
Control	12,798 $\pm$ 3,399	5	17,835 $\pm$ 5,254	84,648 $\pm$ 34,943	56,343 $\pm$ 31,429
MLX:AMX:CD	14,240 $\pm$ 3,067	5	18,989 $\pm$ 1,202	73,524 $\pm$ 20,050	50,130 $\pm$ 17,298
MLX:AMX:Sacarina	15,158 $\pm$ 1,856	5	19,054 $\pm$ 1,203	73,393 $\pm$ 8,411	54,707 $\pm$ 7,056
MLX					
Control	3,238 $\pm$ 0,565	5	2,190 $\pm$ 0,442	117,533 $\pm$ 17,364	103,411 $\pm$ 14,662
MLX:AMX:CD	3,440 $\pm$ 0,163	5	2,169 $\pm$ 0,042	117,379 $\pm$ 10,118	100,719 $\pm$ 9,621
MLX:AMX:Sacarina	3,709 $\pm$ 0,459	5	2,576 $\pm$ 0,308	129,789 $\pm$ 18,731	111,715 $\pm$ 16,437

A continuación, se estudió la bioequivalencia entre ambas formulaciones y las dos formulaciones y la disolución control, mediante la comparación de los valores de  $AUC_0^\infty$  y  $C_{max}$  por un análisis de varianza (ANOVA). Los valores de probabilidad (P) estudiada entre el control y cada una de las formulaciones y entre ambas formulaciones se muestran en la tabla 9.8.

**Tabla 9.8.** Los valores de probabilidad (P) del análisis ANOVA con un nivel de confianza de 95 % entre la disolución control y cada una de las formulaciones estudiadas y entre las dos formulaciones con los valores de  $C_{max}$  y  $AUC_0^\infty$ .

Parámetros	Valor de P		
	Control AMX:MLX:CD	Control: AMX:MLX:Sacarina	<i>MLX:AMX:CD:</i> AMX:MLX:CD
AMX			
$C_{max}$	0,458	0,166	0,544
AUC	0,624	0,591	0,946
MLX			
$C_{max}$	0,419	0,144	0,206
AUC	0,911	0,11	0,009

En primer lugar, con respecto a la AMX, las concentraciones máximas alcanzadas del control y las formulaciones seleccionadas (*MLX:AXM:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*) fueron de 12,7, 14,2 y 15,15  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Las formulaciones desarrolladas obtuvieron unos valores superiores de  $C_{max}$  de antibiótico a la disolución control. En el estudio de Spyker y col. [6] se ha demostrado que con liofilizados de AMX sódica se obtuvieron valores más altos de concentraciones plasmáticas del fármaco. Sin embargo, los valores de P obtenidos en el análisis ANOVA sobre  $C_{max}$  entre ambas formulaciones desarrolladas y entre cada formulación y el control son mayores de 0,05. Por lo tanto no hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de la concentración máxima plasmática entre las dos formulaciones y el control, con un nivel de confianza del 95 %.

Por otro lado, las AUC obtenidas de la disolución control, formulación *MLX:AMX:CD* y *MLX:AXM:Sacarina* fueron las siguientes: 17,8, 18,9 y 19,05  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ , respectivamente, el mayor valor corresponde a la formulación *MLX:AMX:Sacarina* y el menor valor a la disolución control. Sin embargo, los valores de P del análisis de ANOVA son mayores que 0,05 por lo tanto no hay diferencias significativas entre las formulaciones y entre cada formulación y la disolución control.



En cuanto al MLX, los valores más elevados de  $C_{max}$  (3,7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y AUC (2,57  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) correspondieron a la formulación *MLX:AMX:Sacarina*. Los valores de  $C_{max}$  (3,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) del control fueron los más bajos. Sin embargo, el análisis ANOVA de las  $C_{max}$  demuestra que no existen diferencias significativas entre ambas formulaciones, entre cada formulación y la disolución control, ya que los valores de P son todos mayores de 0,05.

El valor más bajo de AUC de MLX (2,169  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) fue el de la formulación *MLX:AMX:CD*. Sin embargo, el análisis ANOVA de AUC de MLX revela que no existen diferencias significativas entre el AUC del control y de la formulación *MLX:AMX:CD* ( $P=0,911$ ) o de la formulación *MLX:AXM:Sacarina* ( $P=0,144$ ). Pero sí hay diferencias significativas entre la formulación *MLX:AMX:Sacarina* con la formulación *MLX:AMX:CD* ( $P=0,009$ ). Por lo tanto la formulación *MLX:AMX:Sacarina* demostró tener la mejor biodisponibilidad.

Los resultados farmacocinéticos obtenidos pueden ser influidos por los excipientes utilizados y el proceso de preparación de las formulaciones. Los excipientes empleados, como CD y Sacarina, aumentaron la solubilidad de MLX, y también de esta forma mejoraron los valores farmacocinéticos y biofarmacéuticos de las formulaciones, siendo la formulación *MLX:AMX:Sacarina* la mejor.

### 9.3. Discusión parcial

Los cambios en los valores plasmáticos de las formulaciones pueden estar directamente relacionados con la composición de las mismas [7], teniendo en cuenta los excipientes utilizados para mejorar la solubilidad de MLX. La absorción, y la distribución de las formulaciones en el organismo siguen un comportamiento análogo presentando todas ellas una distribución bifásica con una primera fase de eliminación rápida seguida de otra mucho más lenta.

En estudio farmacocinético comparativo de las formulaciones seleccionadas y de la disolución control, se ha demostrado que la formulación *MLX:AXM:Sacarina* obtuvo los mejores valores farmacocinéticos, tanto de AUC como de  $C_{max}$ , por lo tanto desde el punto de vista farmacocinético la formulación *MLX:AMX:Sacarina* fue la mejor. Los valores  $T_{max}$  a los 5 min son iguales y los valores obtenidos de RTM y  $T_{1/2\beta}$  son similares entre todas las formulaciones y el control para ambos fármacos.

## Bibliografía

- [1] T. R. Buggins, P. A. Dickinson, and G. Taylor, "The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59, pp. 1482–503, Dec. 2007.
- [2] M.-L. Chen, A. B. Straughn, N. Sadrieh, M. Meyer, P. J. Faustino, A. B. Ciavarella, B. Meibohm, C. R. Yates, and A. S. Hussain, "A modern view of excipient effects on bioequivalence: case study of sorbitol.," *Pharmaceutical research*, vol. 24, pp. 73–80, Jan. 2007.
- [3] D. O. Stichtenoth, B. Wagner, and J. C. Frölich, "Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers.," *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, vol. 45, pp. 44–9, Feb. 1997.
- [4] A. Sánchez Navarro, "New Formulations of Amoxicillin/Clavulanic Acid: A Pharmacok... : Clinical Pharmacokinetics," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 44, no. 11, pp. 1097–1115, 2005.
- [5] U. Busch, J. Schmid, G. Heinzl, H. Schmaus, J. Baierl, C. Huber, and W. Roth, "Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans.," *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 26, pp. 576–84, June 1998.
- [6] D. A. Spyker, R. J. Rugloski, R. L. Vann, and W. M. O'Brien, "Pharmacokinetics of amoxicillin: dose dependence after intravenous, oral, and intramuscular administration.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 11, pp. 132–41, Jan. 1977.
- [7] L. H. Reddy, K. Vivek, N. Bakshi, and R. S. R. Murthy, "Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLN): preparation, characterization, in vitro drug release, and pharmacokinetic evaluation.," *Pharmaceutical development and technology*, vol. 11, pp. 167–77, Jan. 2006.



## Capítulo 10

# Estudio de estabilidad de las formulaciones seleccionadas

En el capítulo se detalla:

- Estudio comparativo de estabilidad de las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*.
- Estudio de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones reconstituidas.
- Caracterización química-física de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

### 10.1. Estudio comparativo de estabilidad de las formulaciones seleccionadas

El estudio de estabilidad de las formulaciones finales *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina* realizado según ICH [1] se ha llevado a cabo con el fin de compararlas y poder establecer su periodo de validez. Para realizar estos estudios se prepararon muestras de los distintos productos liofilizados en viales cerrados bajo las siguientes condiciones de estabilidad:

- Temperatura 25 °C durante un año (condiciones de almacenamiento). Se tomaron muestras a tiempo 0, 15, 30 días, 2, 3, 6 y 12 meses para el estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento.

- Temperatura 40 °C durante seis meses (condiciones de estudio acelerado). Se tomaron muestras a tiempo 0, 15, 30 días, 2, 3 y 6 meses para estudio de estabilidad en condiciones aceleradas.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

**Estabilidad química:** se prepararon soluciones de las muestras tomadas a los distintos tiempos con concentraciones de AMX aproximadamente de 40 µg/ml y MLX aproximadamente de 2 µg/ml, que fueron filtradas por el filtro de membrana de 0,45 µm, valorando por duplicado los contenidos de MLX y AMX mediante el método de HPLC explicado en el apartado 4.3.7. Los contenidos de principios activos deben estar comprendidos entre 90-110 % para que puedan ser consideradas como estables.

**Estabilidad física:**

- *Propiedades organolépticas del producto liofilizado:* Se evaluaron los cambios de color, olor de las muestras tomadas a los distintos tiempos en comparación con la muestra estudiada al comienzo del estudio. Las muestras se consideraron estables siempre que presenten un color amarillo claro, sean compactas y prácticamente inodoras.
- *Reconstitución, aspecto y propiedades organolépticas del líquido reconstituido:* Se estudió la facilidad en la reconstitución de las muestras tomadas a los distintos tiempos, así como su aspecto, aparición de precipitados, color y olor. Las muestras se consideraron como estables siempre que su tiempo de reconstitución fuese corto y diesen lugar a una solución límpida y transparente, de color amarillo claro.
- *pH del reconstituido:* Se evaluaron los cambios de pH de las formulaciones reconstituidas a cada tiempo mediante el empleo de un pHmetro Mettler Toledo® MP230. El pH de las distintas muestras debía estar comprendido entre 7,4 y 8,8 para ser consideradas como estables.
- *Tamaño de las partículas del reconstituido:* Se determinó el tamaño de las partículas de las muestras tomadas a los distintos tiempos mediante el equipo Microtrac Zetatrak. El líquido reconstituido debe ser una disolución libre de partículas, por lo tanto el tamaño de las partículas no supera 1 nm.

La AMX se degrada con facilidad mediante un proceso de hidrólisis. AMX en disolución acuosa almacenada durante 7 días a temperatura ambiente, pierde un 50 % de su actividad, mientras que a una temperatura de 4 °C, prácticamente no se degrada [2]. Sin embargo, de acuerdo con los trabajos de Erah y col. [3], en los medios con un intervalo de pH de 4,0-8,0 la AMX presenta una elevada estabilidad con porcentajes de degradación inferiores a un 0,8 % después de 60 min a temperatura 37 °C. Por lo tanto, durante la preparación de las formulaciones liofilizadas de MLX y AMX sódica mediante un proceso de disolución de AMX en un tampón pH 8,8 y su posterior de liofilización, la cantidad de este antibiótico degradada por hidrólisis en medio alcalino es mínima, ya que su valoración por un método selectivo, como es el HPLC, en las formulaciones obtenidas revela un rendimiento casi del 100 %. Se han descrito en la literatura varios estudios de estabilidad de diferentes formas farmacéuticas de AMX [4, 5, 6, 7, 8], demostrando que la materia prima seca, y los polvos de administración oral secos, y cápsulas de AMX mantienen su actividad completa durante 5 años, aunque normalmente el período de validez es de 3 años.

MLX es una molécula químicamente estable [9]. La formulación inyectable de MLX ha demostrado ser estable durante 36 meses a 25 °C/HR 60 % [10]. En un estudio de estabilidad realizado por Nalluri y col. [11] se ha observado que los comprimidos de MLX y ciclodextrina se mantienen estables durante 6 meses en condiciones aceleradas de 40 °C/HR 75 %.

En las tablas 10.1 y 10.2 se resumen los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados sobre la formulación liofilizada *MLX:AMX:CD*. A temperatura ambiente (25 °C) la formulación permaneció estable física y químicamente, ya que al cabo de 12 meses de almacenamiento, no se produjeron cambios en las propiedades del producto liofilizado ni del líquido reconstituido. Los valores de pH, tamaño medio de las partículas y contenido en principios activos sufrieron alteraciones con el tiempo, pero se mantuvieron dentro de los límites de aceptación.

Por otro lado, las formulaciones *MLX:AMX:CD* almacenadas a 40 °C, al cabo de 6 meses, no sufrió variaciones en las propiedades organolépticas tanto en el producto liofilizado como en su disolución reconstituida. Sin embargo, se observó una ligera disminución del pH que permaneció dentro del rango de la normalidad (de 7,4-8,8) y un incremento de tamaño medio de las partículas: 1,720 nm a los 6 meses. El contenido de AMX a ese mismo tiempo disminuyó, representando un 89,12 % (por debajo de los límites de aceptación), mientras el contenido de MLX sigue manteniendo a 96,8 %, debido a que el antibiótico es menos estable al calor que el antiinflamatorio.

**Tabla 10.1.** Resultado de estudio de estabilidad de formulación *MLX:AMX:CD* a temperatura 25 °C

Parámetro analizado	Tiempo (días)						
	0	15	30	60	90	180	365
Propiedades del liofilizado	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Aspecto del reconstituido	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Tiempo de reconstitución	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
pH	8,06±0,04	8,04±0,04	8,04±0,036	8,05±0,03	8,06± 0,02	8,05±0,04	8,06±0,03
Tamaño medio de partículas (nm)	0,94	0,99	0,99	0,91	0,98	0,94	0,94
Contenido de AMX (%)	99,1±0,2	100,89±1,98	98,89±0,50	97,15±1,65	96,71±0,44	95,96±3,78	95,45±0,62
Contenido de MLX (%)	99,6±0,06	97,37±2,27	100,16±1,69	101,16±0,78	99,18±1,24	98,89±0,71	98,75±0,62

**Tabla 10.2.** Resultado de estudio de estabilidad de formulación *MLX:AMX:CD* a temperatura 40 °C

Parámetro analizado	Tiempo (días)					
	0	15	30	60	90	180
Propiedades del liofilizado	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Aspecto del reconstituido	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Tiempo de reconstitución	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
pH	8,06±0,04	8,12±0,04	8,07±0,05	8,14±0,06	7,89±0,03	7,85±0,02
Tamaño medio de partículas (nm)	0,940	0,95	0,94	1,340	1,450	1,720
Contenido de AMX (%)	99,1±0,2	98,85±0,01	97,1±0,01	96,94±1,17	93,06±0,34	89,12±0,77
Contenido de MLX (%)	99,6±0,06	98,86±0,01	98,72±0,58	97,12±0,33	96,23±0,29	96,8±0,50

En las tablas 10.3 y 10.4 se resumen los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados sobre las formulaciones liofilizadas *MLX:AMX:Sacarina*. En los estudios a 25 °C esta formulación también permaneció estable tanto física como químicamente durante 1 año, ya que no se produjeron cambios organolépticos ni en los liofilizados ni en las soluciones reconstituidas, siendo el liofilizado de un color amarillo, de una estructura consistente y prácticamente inodoro y el líquido reconstituido transparente y de un color amarillo claro. Tampoco se observaron variaciones en el tamaño de las partículas de la solución constituida y el valor de pH permaneció constante con un valor aproximado de 8,0. Además, los contenidos en ambos principios activos estaban comprendidos dentro de los valores considerados normales.

Los resultados de los estudios acelerados de esta formulación *MLX:AMX:Sacarina* se muestran en la tabla 10.4. Las propiedades organolépticas de los liofilizados, el aspecto de las soluciones reconstituidas y el tiempo de reconstitución permanecieron en el rango de especificaciones. Sin embargo, al finalizar el estudio (a los 6 meses) se produjo una disminución del pH a 7,65, este valor permanece en el rango de aceptación pero indica que la temperatura de almacenamiento afecta a la estabilidad física de la formulación. Además, el tamaño medio de las partículas aumentó a 1,450 nm en las soluciones obtenidas. Los contenidos de MLX y AMX también disminuyeron hasta un 95,74 % y 90,12 %, respectivamente, manteniéndose dentro de los límites de aceptación. Por lo tanto se empieza a observar variaciones tanto en propiedades físicas como químicas de la formulación a partir de los 6 meses de almacenamiento a la temperatura de 40 °C.



**Tabla 10.3.** Resultado de estudio de estabilidad de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* a 25 °C.

Parámetro analizado	Tiempo (días)						
	0	15	30	60	90	180	365
Propiedades del liofilizado	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Aspecto del reconstituido	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Tiempo de reconstitución	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
pH	8,19±0,03	8,26±0,05	8,04±0,03	8,17±0,08	8,12± 0,09	8,09±0,03	8,19±0,05
Tamaño medio de partícula (nm)	0,940	0,91	0,97	0,91	0,92	0,93	0,91
Contenido de AMX (%)	100,1±0,2	100,13±1,58	100,78±0,71	98,56±1,01	100,03±2,51	98,25±0,33	99,02±0,30
Contenido de MLX (%)	100,0±0,06	103,01±0,29	99,95±2,12	100,51±0,37	97,81±0,77	99,18±1,68	99,56±0,04

**Tabla 10.4.** Resultado de estudio de estabilidad de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* a 40 °C.

Parámetro analizado	Tiempo (días)					
	0	15	30	60	90	180
Propiedades del liofilizado	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Aspecto del reconstituido	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
Tiempo de reconstitución	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
pH	8,19±0,03	8,02±0,02	7,91±0,09	7,85±0,05	7,77±0,08	7,65±0,02
Tamaño medio de partículas (nm)	0,940	0,930	0,970	0,930	1,450	1,450
Contenido de AMX (%)	100,1±0,2	98,5±0,61	98,27±0,67	97,95±1,2	91,47±0,83	90,12±2,37
Contenido de MLX (%)	100,0±0,06	98,95±0,88	97,52±0,84	97,26±0,15	96,95±1,58	96,74±0,64

Como conclusión del estudio comparativo de estabilidad de las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*, se puede confirmar la estabilidad de ambas formulaciones tanto física como químicamente a 25 °C durante un año. Se observó una disminución de los contenidos de ambos fármacos y también una variación en el tamaño medio y pH de las disoluciones reconstituidas a 40 °C. El MLX demostró ser más estable frente al calor que AMX.

La formulación *MLX:AMX:Sacarina* ha demostrado ser ligeramente más estable químicamente a 40 °C. Además, el excipiente utilizado, Sacarina, ofrece también la ventaja de resultar más económico. Por lo tanto se llevó a cabo un estudio de caracterización de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* mediante la técnica instrumental DSC, que se detallará en el apartado 10.3.

## 10.2. Estudio de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones seleccionadas

Se estudiaron la estabilidad a la temperatura ambiente de las disoluciones obtenidas después de la reconstitución de los productos liofilizados. El objetivo fue determinar el intervalo de tiempo que podría transcurrir entre la reconstitución de la formulación y su administración, sin que se produjesen fenómenos de degradación de principios activos, según ICH [1].

Al tratarse de formulaciones de administración inmediata después de su reconstitución, los estudios de estabilidad se realizaron durante 24 horas, ya que, considerando que la administración es por vía intramuscular, un día suponía un margen de seguridad suficientemente amplio ante retrasos en la administración de dicho preparado.

Para realizar el estudio, se procedió a la reconstitución con agua destilada del producto liofilizado, almacenándose posteriormente a temperatura ambiente. Durante todo el estudio se observó si se producían alteraciones en el aspecto externo del reconstituido, con aparición de precipitados, o alteraciones en el color o en la transparencia de las muestras almacenadas. Se tomaron muestras al inicio y al final del estudio, sobre las que se evaluaron los siguientes parámetros:

**Estabilidad química:** se prepararon soluciones de las muestras tomadas a los distintos tiempos con concentraciones de AMX aproximadamente de 40 µg/ml y MLX aproximadamente de 2 µg/ml, que fueron filtradas por el filtro de membrana de 0,45 µm, valorando por duplicado los contenidos de MLX y AMX mediante el método

de HPLC explicado en el apartado 4.3.7. Los contenidos de principios activos deben estar comprendidos entre 90-110 % para que puedan ser consideradas como estables.

**Estabilidad física:** se valoraron los cambios en el aspecto (color, olor, transparencia), el tamaño de partículas y pH de los sistemas reconstituidos, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo. Las disoluciones fueron consideradas estables siempre que presentaran un tamaño de partículas inferior a 1  $\mu$ m, valores de pH comprendidos entre 7,4 y 8,8, color amarillo claro, y un aspecto totalmente transparente.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones reconstituidas aparecen reflejados en la tabla 10.5.

**Tabla 10.5.** Resultado de estudio de estabilidad en condiciones de utilización de las formulaciones *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*.

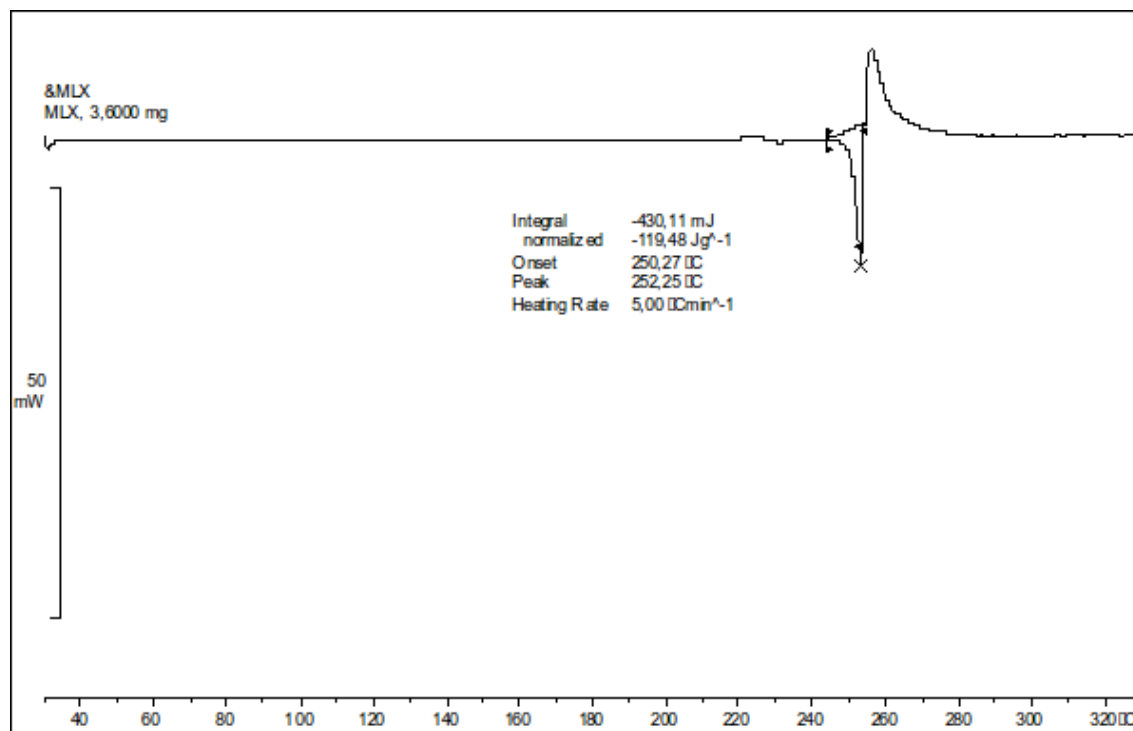
Parámetros analizados					
Tiempo (horas)	Aspecto	Tamaño medio de las partículas (nm)	pH	Contenido de AMX (%)	Contenido de MLX (%)
Formulación <i>MLX:AMX:CD</i>					
0	Cumple	0,91	7,98 $\pm$ 0,10	99,7 $\pm$ 0,02	98,5 $\pm$ 0,03
24	Cumple	0,96	8,02 $\pm$ 0,09	98,6 $\pm$ 0,07	98,7 $\pm$ 0,04
Formulación <i>MLX:AMX:Sacarina</i>					
0	Cumple	0,947	8,13 $\pm$ 0,04	98,7 $\pm$ 0,07	99,3 $\pm$ 0,01
24	Cumple	0,97	8,09 $\pm$ 0,10	98,1 $\pm$ 0,03	98,9 $\pm$ 0,24

Las dos formulaciones seleccionadas siguieron siendo estables en todos los aspectos analizados en un periodo de 24 horas tras su reconstitución.

### 10.3. Caracterización de formulación *MLX:AMX:Sacarina* por DSC

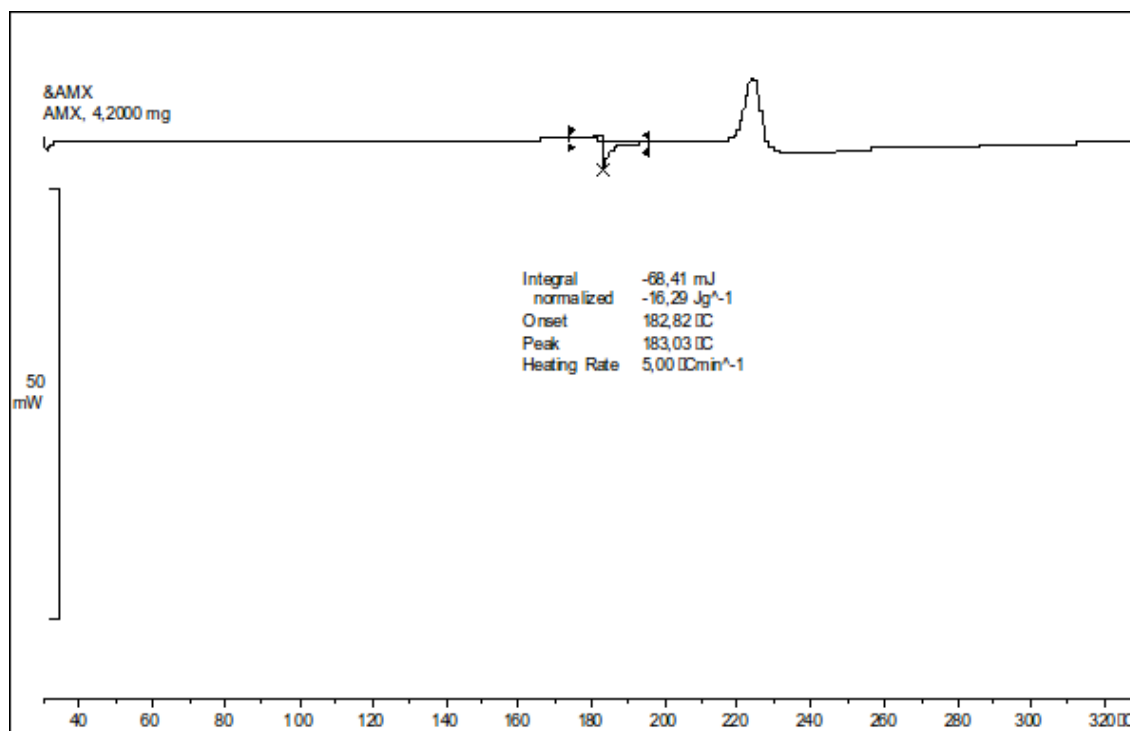
Con el fin de observar si existen cambios en la estructura cristalina de las formulaciones seleccionadas al utilizar excipientes como glicina y sacarina sódica para mejorar la solubilidad de MLX, se realizó un estudio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las materias primas, mezcla física entre excipientes, mezcla física de la formulación, el placebo y la formulación *MLX:AMX:Sacarina*.

El termograma de MLX (Fig. 10.1.) muestra un pico endotérmico a 252,25 °C, correspondiente a su punto de fusión, y un punto exotérmico, a continuación. Esto se explica por la degradación de MLX [9].



**Figura 10.1.** Espectro calorímetro de MLX.

El termograma de AMX (Fig. 10.2) muestra un pico endotérmico a 183,03 °C ( $\Delta H = -16,29 \text{ Jg}^{-1}$ ), también correspondiente a su temperatura de fusión. Marciniec y cols. [8] observaron que la AMX trihidrato poseía un punto de fusión similar a 190,1 °C. Además, la AMX muestra un pico exotérmico que corresponde a su degradación [12].



**Figura 10.2.** Espectro calorímetro de AMX.

Con respecto a la glicina (Fig. 10.3), se puede observar que se produce la aparición de un único pico endotérmico correspondiente al punto de fusión del compuesto a 246,17 °C ( $\Delta H = -1441,82 \text{ Jg}^{-1}$ ) [13].

Por el contrario, en el termograma de sacarina sódica (Fig. 10.4) aparecen dos picos endotérmicos, un pico a 128 °C y un pico a 216 °C. El primer pico corresponde a la cantidad de agua existente en la muestra de sacarina sódica, los picos endotérmicos de 100-160 °C, suelen coincidir con la pérdida de agua en las muestras [14]. El segundo pico a 216 °C ( $\Delta H = -74,77 \text{ Jg}^{-1}$ ) corresponde al punto de fusión del compuesto [13].

En el termograma de la mezcla física (1:20) de dos principios activos MLX, y AMX (Fig. 10.5), aparecen dos picos endotérmicos correspondientes a los puntos de fusión de ambos principios activos MLX y AMX a 252 °C y 183 °C, respectivamente. De esta manera demostró que no hay interacción entre las dos sustancias activas. Someshwar K y cols. [15] también utilizaron la técnica DSC para estudiar la interacción entre la tizanidina y los excipientes usados en los comprimidos efervescentes, y el pico endotérmico de tizanidina se conservó al mezclarse con los excipientes indicando la no interacción entre el fármaco y excipientes.

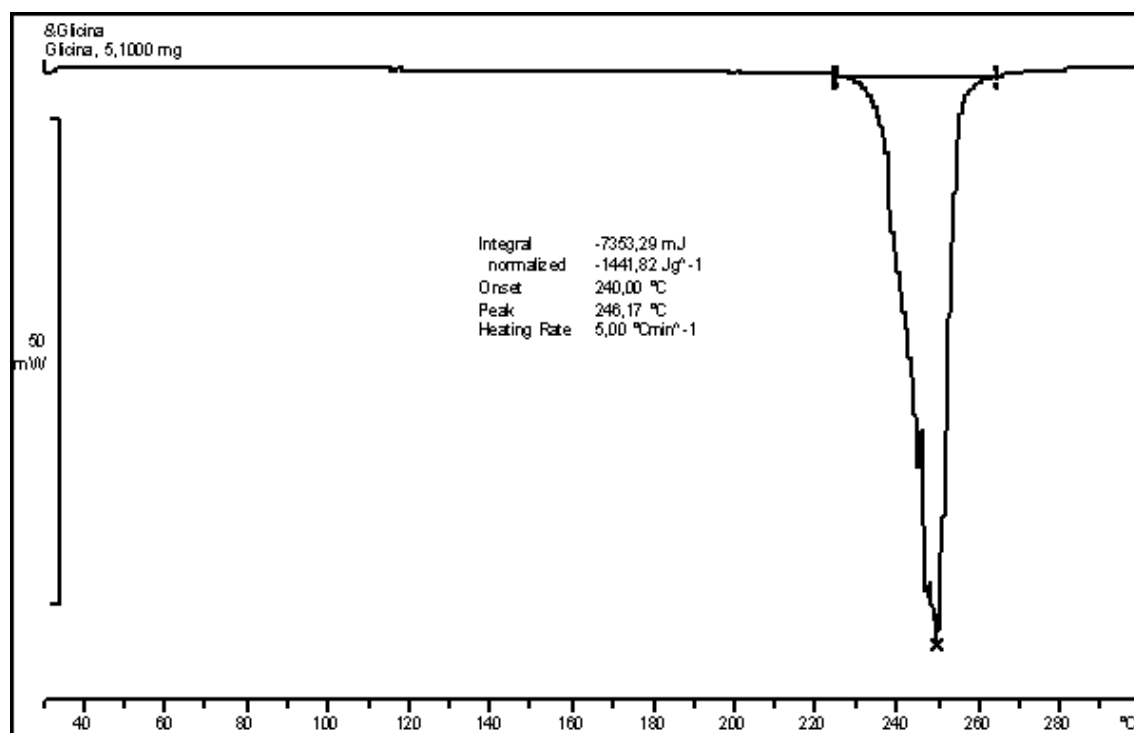


Figura 10.3. Espectro calorimétrico de glicina.

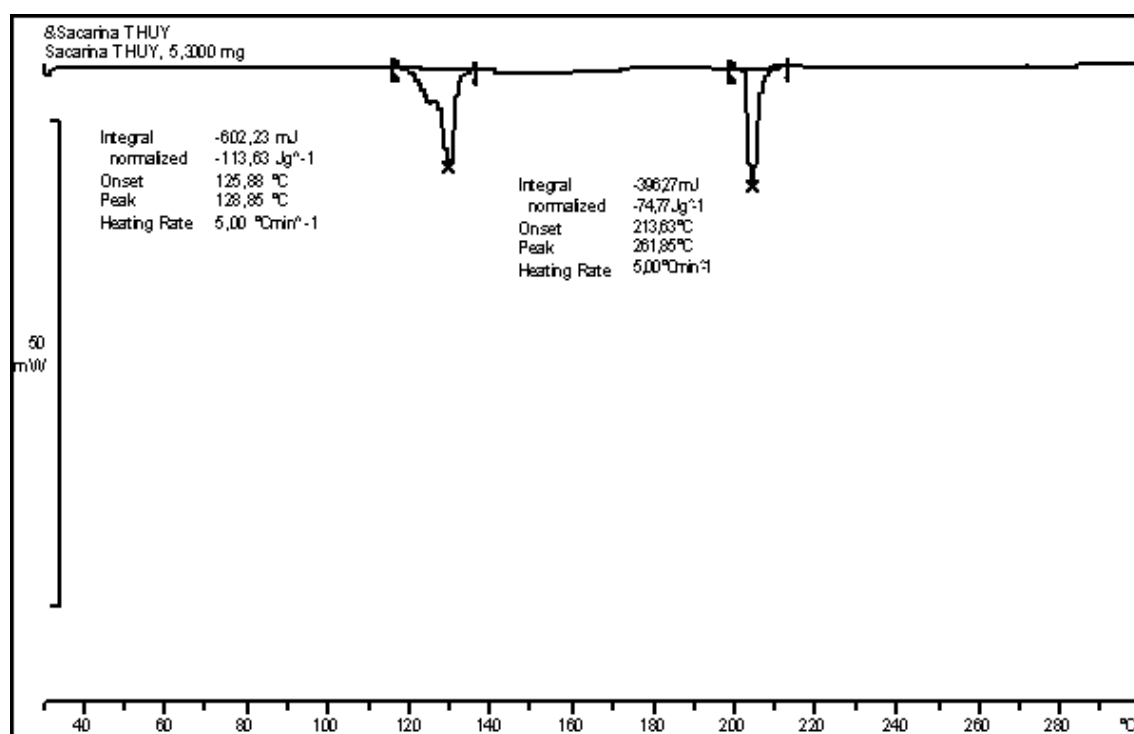
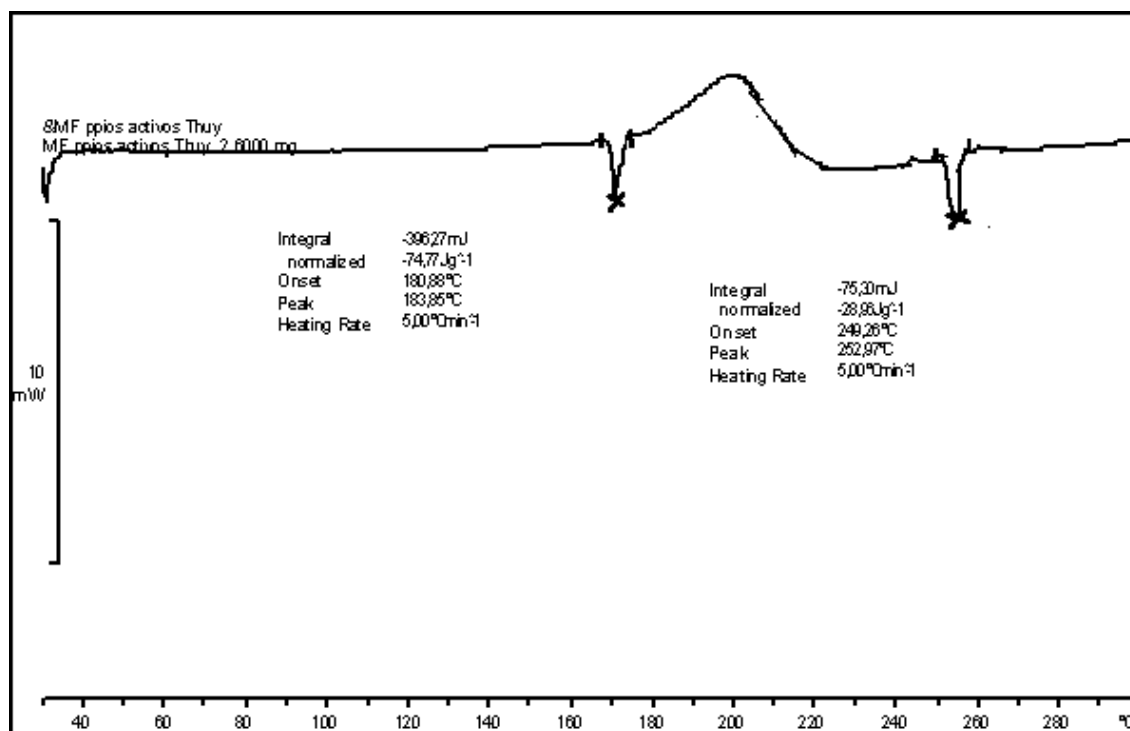


Figura 10.4. Espectro calorimétrico de sacarina sódica.

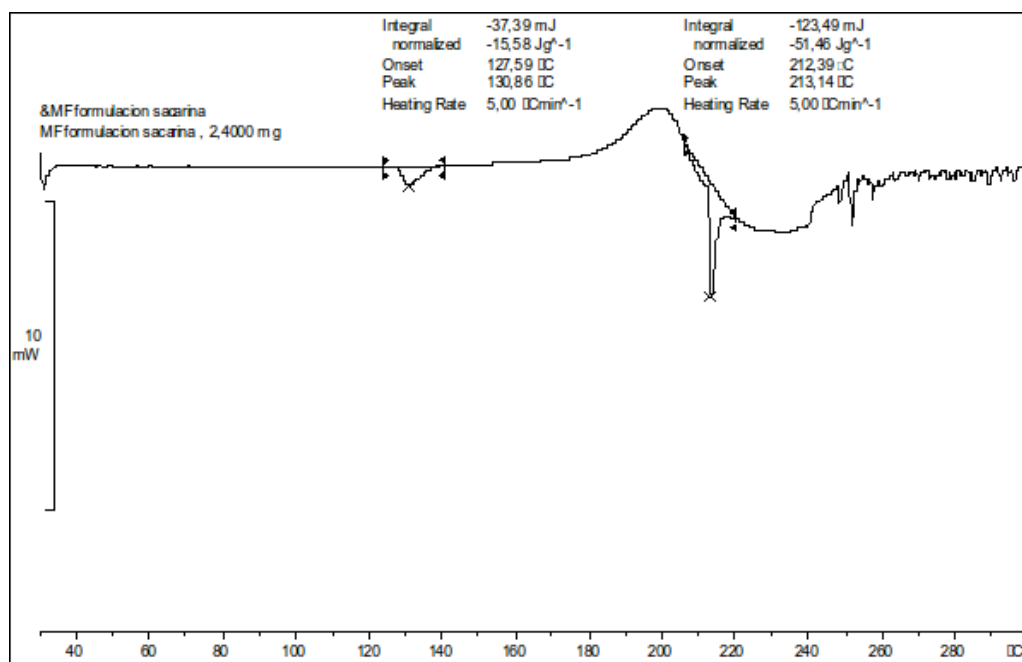


**Figura 10.5.** Espectro calorimétrico de la mezcla de *MLX:AMX* a la relación 1:20.

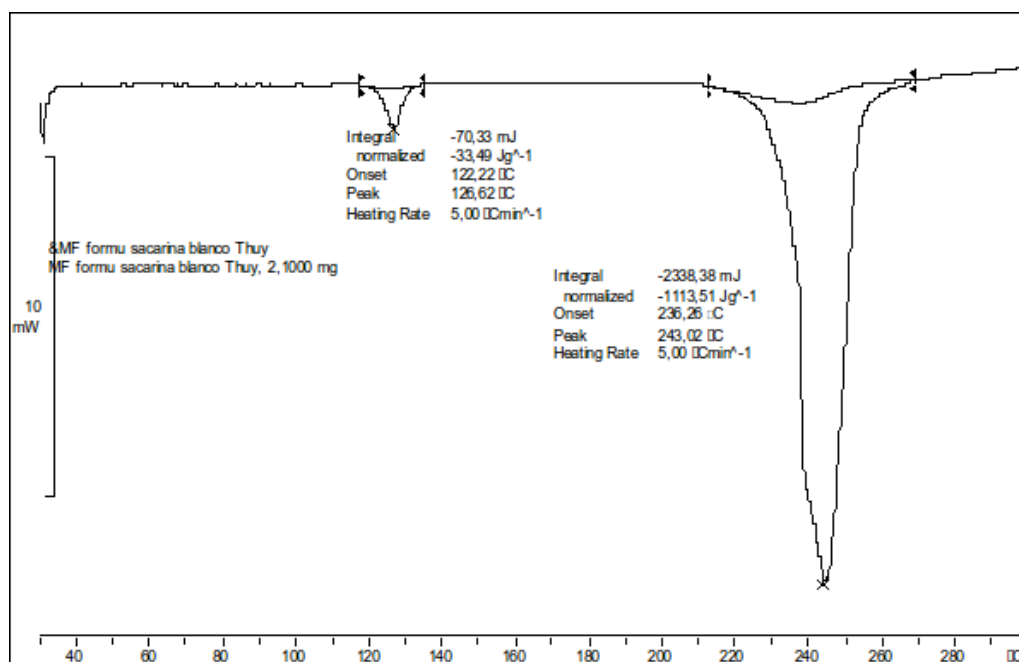
Con respecto al termograma de la mezcla física de *AMX*, *MLX*, glicina y sacarina sódica correspondiente a la formulación desarrollada (Fig. 10.6) se observaron dos picos endotérmicos, uno a 130 °C, tal vez debido a la pérdida de agua existente en la muestra y otro a 213 °C, correspondiente a la sacarina sódica. Asimismo, ya no aparecen los picos correspondientes a los fármacos. De alguna forma, el efecto de disolución de los fármacos con los excipientes usados causa la desaparición de los picos [16].

En el termograma del placebo de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* (Fig. 10.7), se observaron se observaron dos picos endotérmicos, uno a 126 °C tal vez debido a la pérdida de agua existente en la muestra y otro a 243 °C, correspondiente a la glicina. La disolución de excipiente sacarina sódica en el tampón glicina/*NaOH* pH 8,8 y su posterior proceso de liofilización hace que se desaparece los picos correspondientes a cada componente, Lu y Pikal surgieron que la estructura cristalina rígida de glicina proporciona un buen matrix para soportar el “cake” de liofilizado [17].

En el termograma de la formulación *MLX:AMX:Sacarina*, sólo aparece un pico endotérmico a 154 °C, y desaparecen los picos correspondientes a cada componente del inyectable, indicando la desaparición de la estructura cristalina inicial de ambos principios activos. Nassab y col. [9] obtuvieron un resultado similar cuando realizaron



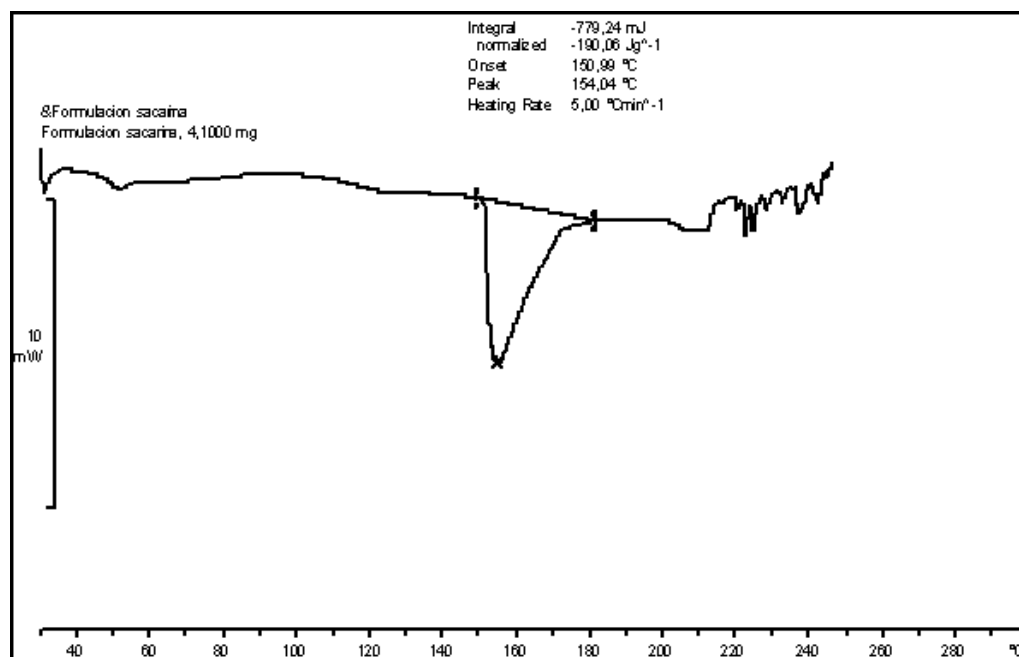
**Figura 10.6.** Espectro calorimétrico de la mezcla física de MLX, AMX, glicina y sacarina sódica correspondiente a la formulación *MLX:AMX:Sacarina*.



**Figura 10.7.** Espectro calorimétrico del placebo de la formulación *MLX:AMX:Sacarina*.



un estudio sobre el complejo binario entre MLX y manitol.



**Figura 10.8.** Espectro calorimétrico de la formulación *MLX:AMX:Sacarina*.

## 10.4. Conclusión parcial

El estudio de estabilidad ha demostrado que las formulaciones seleccionadas son estables físicamente y químicamente hasta un año de estudio. También las formulaciones reconstituidas son estables tanto físicamente y químicamente durante 24 horas después de su reconstitución.

El estudio de caracterización por DSC para la formulación *MLX:AMX:Sacarina*, ha mostrado que esta formulación posee una estructura amorfa ya que desaparecen los picos endotérmicos característicos de cada componente de partida.

## Bibliografía

- [1] I. H. T. Guideline, *Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products*. ICH Q1A (R2) (CPMP/ICH/2736/99).
- [2] K. Pranab and C. W. Bhattacheryya, "Amoxycillin," in *Analytical Profiles of Drug substances. Volume 7* (K. Florey, ed.), pp. 19–41, London: Academic Press, Inc., 1973.

- [3] P. O. Erah, A. F. Goddard, D. A. Barrett, P. N. Shaw, and R. C. Spiller, "Original articles," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 39, pp. 5–12, 1997.
- [4] P. Pérez-Lozano, E. García-Montoya, A. Orriols, M. Miñarro, J. R. Ticó, and J. M. Suñé-Negre, "Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 42, pp. 192–9, Sept. 2006.
- [5] T. Sahasathian, T. Kerdcholpetch, A. Chanweroch, N. Praphairaksit, N. Suwonjandee, and N. Muangsin, "Sustained release of amoxicillin from chitosan tablets.," *Archives of pharmacal research*, vol. 30, pp. 526–31, Apr. 2007.
- [6] F. E. B. Silva and C. D. P. Kratz, "Development and Evaluation of Amoxicillin Formulations by Direct Compression : Influence of the Adjuvants on Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of the Tablets," *Acta Farm. Bonaerense*, vol. 24, no. 1, pp. 39–47, 2005.
- [7] Croubels S., De Baere S., and De Backer P., "Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage," *Analytica Chimica Acta*, vol. 483, no. 1, p. 9, 2003.
- [8] B. Marciniak, Z. Płotkowiak, L. Wachowski, M. Kozak, and M. Popielarz-Brzezińska, "Analytical Study of  $\beta$ -Irradiated Antibiotics in the Solid State," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 68, no. 2, p. 14, 2002.
- [9] P. R. Nassab, R. Rajkó, and P. Szabó-Révész, "Physicochemical characterization of meloxicam-mannitol binary systems.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 41, pp. 1191–7, June 2006.
- [10] H. A. Turp, A. Türkyilmaz, and C. Akdogan, "Pharmaceutical formulations of meloxicam," 2010.
- [11] B. N. Nalluri, K. P. R. Chowdary, K. V. R. Murthy, G. Becket, and P. a. Crooks, "Tablet formulation studies on nimesulide and meloxicam-cyclodextrin binary systems.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, p. Article 36, Jan. 2007.

- 
- [12] C. Bisson-Boutelliez, S. Fontanay, C. Finance, and F. Kedzierewicz, "Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin beta-cyclodextrin complexes.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, pp. 574–81, June 2010.
- [13] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press, 2006.
- [14] M. A. A. O'Neill and S. Gaisford, "Application and use of isothermal calorimetry in pharmaceutical development.," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 417, pp. 83–93, Sept. 2011.
- [15] K. Someshwar, K. Chithaluru, T. Ramarao, and K. K. K. Kumar, "Formulation and evaluation of effervescent floating tablets of tizanidine hydrochloride.," *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, vol. 61, pp. 217–26, June 2011.
- [16] H. A. EL-MARADNY, S. A. MORTADA, O. A. KAMEL, and A. H. HIKAL, "Characterization of ternary complexes of meloxicam-HP $\beta$ CD and PVP or L-arginine prepared by the spray-drying technique," *Acta pharmaceutica*, vol. 58, no. 4, pp. 455–466, 2008.
- [17] X. Lu and M. J. Pikal, "Freeze-drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure.," *Pharmaceutical development and technology*, vol. 9, pp. 85–95, Jan. 2004.

## Discusión final

Se ha estudiado la influencia de varios excipientes apropiados para la administración parenteral: surfactantes (Tween<sup>®</sup> 80, Span<sup>®</sup> 85, lecitina de soja), hidratos de carbono (manitol, glucosa, sorbitol), sacarina sódica, un polímero aniónico (carboximetilcelulosa) e hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina en la solubilidad de MLX en medio acuoso y en tampón NaOH/glicina a pH 7,4, 8,8 y 9,8. Se observa que los surfactantes mejoran el coeficiente de saturación de MLX en agua debido a la formación de micelas, los azúcares (con excepción de manitol), sacarina sódica y carboximetilcelulosa ayudan a aumentar la solubilidad máxima de MLX mediante la formación de los puentes de hidrógeno, y la hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina forma un complejo de inclusión 1:1 con MLX aumentando de este manera su solubilidad. La molécula de MLX presenta dos valores de pKa (4,18 y 1,09). En los medios a pH 7,4, 8,8 y 9,8, por encima del pKa 4,18 del fármaco su solubilidad aumenta al ionizarse su molécula. Sin embargo, la solubilidad de MLX no sólo depende del pH del medio, sino también de su fuerza iónica, por lo tanto al aumentar el pH del medio hasta 11,2, la solubilidad de saturación de MLX disminuye debido a su momento multipolar bastante acentuado. También, un incremento de solubilidad de MLX se observó al aumentar la cantidad de glicina en el tampón glicina/NaOH de pH 8,8.

Mediante el potencial de solubilización  $k$  calculado sobre el coeficiente de solubilidad de MLX para los distintos sistemas tampón: excipiente, se obtuvieron los dos aditivos (Tween<sup>®</sup> 80 y sacarina sódica) que más aumentan la solubilidad del principio activo. Asimismo la presencia de hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina en los tampones pH 8,8 y 9,8 aumenta la solubilidad total de MLX.

A partir de los resultados de las pruebas de solubilidad, se han realizado varias formulaciones de MLX liofilizadas a dosis de 5 mg/ml. Se llevó a cabo la caracterización de estas primeras formulaciones mediante la prueba de reconstitución, la medición de pH, los aspectos organolépticos y la valoración química. Se obtuvieron dos formulaciones (MLX:CD y MLX:Sacarina) que mostraron los mejores

resultados de solubilidad, debido a la utilización de sacarina sódica e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, realizados en el tampón pH 8,8, más cercano al pH fisiológico. Partiendo de estas formulaciones, se elaboraron los inyectables de dos principios activos MLX y AMX (formulación *MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*) mediante la solubilización de MLX y AMX a pH 8,8 en presencia de los excipientes: sacarina sódica al 0,9 % e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina al 7,5 % y posteriormente fueron liofilizadas.

Las formulaciones finales (*MLX:AMX:CD* y *MLX:AMX:Sacarina*) cumplieron con la prueba de reconstitución, ya que al añadir el agua destilada el liofilizado se disolvió instantáneamente obteniéndose disoluciones lípidas, transparentes y de color amarillo. Respecto a la valoración del contenido de los principios activos, se obtuvieron valores dentro de los límites de aceptación. Se ha observado un descenso del pH final de la disolución reconstituida, mostrando un valor alrededor de 8,1. Este descenso puede ser debido a las características ácidas de MLX y de los excipientes utilizados.

A continuación, se ha realizado el estudio de caracterización físico-química de las formulaciones liofilizadas mediante las siguientes técnicas instrumentales: IR, XRD, SEM ya que son útiles en el estudio de productos sólidos.

Se ha realizado un estudio de IR para las formulaciones que contenían sólo MLX (formulación *MLX:CD* y *MLX:Sacarina*). Se ha observado que en el espectro IR de la formulación *MLX:CD*, una de las bandas específicas de la sustancia activa, correspondiente a la vibración elástica de los grupos carbonilo ( $1612,22\text{ cm}^{-1}$ ), se desplazó y disminuyó de intensidad. Además, no se detectó la vibración de tensión atribuida a los grupos amida, indicando la existencia de una fuerte interacción entre MLX y la HP- $\beta$ -CD. Probablemente, estos cambios tan drásticos fueron debidos a la formación de puentes de hidrógeno entre la molécula hospedadora (HP- $\beta$ -CD) y el huésped (MLX). Por otro lado, en el estudio IR de la formulación *MLX:Sacarina* se ha observado un descenso en la intensidad de las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los enlaces N-H y S=O de la sustancia activa, además de un ligero desplazamiento de la señal asignada a la vibración de tensión del enlace C=N y un pico característico de los enlaces C-O a  $3415,0\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de la sacarina sódica y de la glicina. Estos resultados permiten considerar que posiblemente se hayan formado interacciones entre los grupos N-H y C=N del MLX, y los C=O de la glicina.

En el estudio de XRD, partiendo de las materias primas de naturaleza cristalina, el espectro de difracción para ambas formulaciones finales *MLX:AMX:CD* y

*MLX:AMX:Sacarina* muestra un perfil sin picos de intensidad destacada indicando la naturaleza amorfa de los liofilizados. El resultado de esta pérdida de cristalinidad posiblemente es debida al proceso de preparación de las formulaciones y liofilización llevados a cabo, causando que las sustancias se disuelvan totalmente en los medios utilizados. En el estudio de SEM, las microfotografías obtenidas de las formulaciones demuestran las estructuras planas con algunas escamas en la superficie. Este resultado es acorde con los obtenidos en XRD ya que las sustancias de partida pierden totalmente su forma cristalina. La estructura amorfa de las formulaciones facilita su solubilización, de ahí que puedan cumplir con la prueba de reconstitución

Se tratan de formulaciones para uso parenteral, por lo tanto es necesario realizar las pruebas sobre su inocuidad antes de su aplicación in vivo. El estudio de hemólisis es un método sencillo y fiable para estimar el posible daño que se produce en la membrana celular debido a la acción de ciertas sustancias hemolíticas. La hemólisis puede ser causada por las sustancias activas y los excipientes utilizados. Las sustancias activas: AMX y MLX han demostrado ser hemocompatibles, sin embargo los excipientes usados: ciclodextrina y sacarina sódica poseen efectos hemolíticos según la bibliografía consultada. Por lo tanto, se ha realizado el estudio con las formulaciones finales en una relación de formulación:sangre 1:1, manteniéndolos en contacto durante una hora. El resultado del porcentaje de hemólisis (H) de las formulaciones y sus placebos es inferior a 2 %, muy por debajo del valor crítico 10 % (por encima del cual se podría producir un hemólisis in vivo). Se ha observado que el porcentaje de hemólisis de la formulación *MLX:AMX:CD* es inferior al porcentaje de su placebo mostrando que la ciclodextrina causa un menor efecto hemolítico cuando está formando el complejo de inclusión con el fármaco. Por otro lado, se ha realizado la prueba de precipitación in vitro que es un método sencillo para valorar el posible riesgo de precipitación de las sustancias activas con baja solubilidad acuosa. La prueba de precipitación in vitro estática consiste en la dilución en serie de las formulaciones con PBS, para la visualización durante 1 hora de la posible aparición de precipitados y la posterior valoración espectrofotométrica de MLX después de 24 horas. El resultado obtenido en esta prueba es la ausencia de precipitaciones durante la primera hora tras su disolución en serie de ambas formulaciones, asimismo las cantidades valoradas espectrofotométricamente de MLX en cada disolución obtenida corresponden a la cantidad teórica de la misma. Por lo tanto, a pH fisiológico no se produce la precipitación de este principio activo.

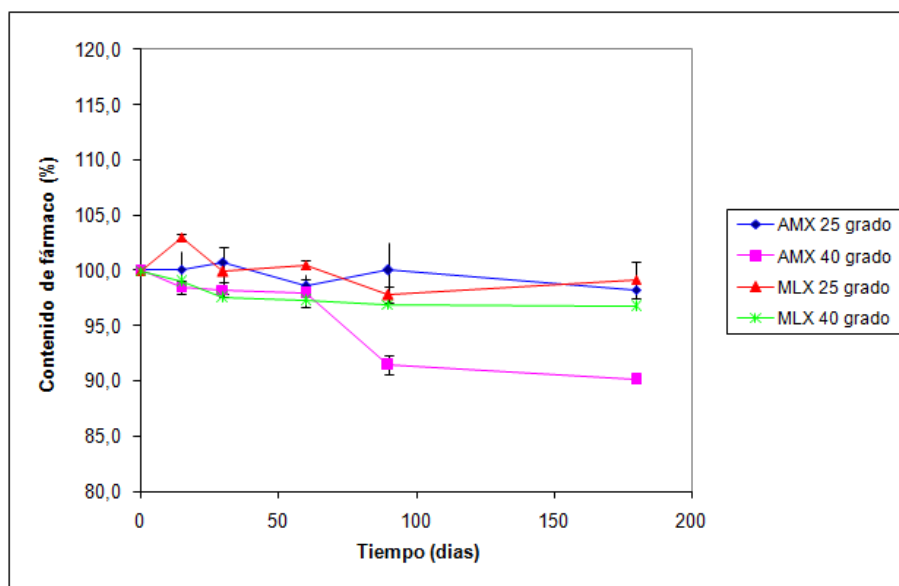
Se ha llevado a cabo un estudio farmacocinético comparativo de las formulaciones finales y de la disolución control utilizando ratones como animales de experimentación. Se han obtenido los perfiles farmacocinéticos similares tanto de MLX y AMX entre ambas formulaciones y de la disolución control. Se obtuvieron las concentraciones plasmáticas máximas de MLX y AMX a los 5 min después de su administración i.m., demostrando así una rápida absorción. Además, se han comparado algunos parámetros farmacocinéticos entre ambas formulaciones y la disolución control, que son la concentración máxima plasmática ( $C_{max}$ ) y el área bajo la curva (AUC). Se observa que  $C_{max}$  y AUC de las formulaciones estudiadas son superiores que las obtenidas por la disolución control. El uso de excipientes mejora la solubilidad de MLX y posiblemente produce un incremento de su biodisponibilidad. Por otro lado, entre ambas formulaciones seleccionadas la que posee los mejores parámetros farmacocinéticos corresponde a la formulación *MLX:AMX:Sacarina*.

También se ha realizado un estudio de estabilidad de las formulaciones finales en dos condiciones de almacenamiento diferentes: a temperatura ambiente (25°C) durante 12 meses y en condiciones aceleradas (40°C) durante 6 meses. Se valoraron las propiedades tanto físicas como químicas de los inyectables. Dentro de las propiedades físicas se estudiaron sus propiedades organolépticas, el tiempo de reconstitución, el pH y el tamaño de partícula. En todos los parámetros no se observaron cambios durante los 12 meses de estudio. La cantidad de MLX y AMX valorada por HPLC cumplió los límites de aceptación (90-110 %) durante los 12 meses del estudio a 25°C (ver Fig. 50,51)). En el estudio de estabilidad bajo condiciones aceleradas se ha observado una mayor degradación de las sustancias activas. A los 6 meses el contenido de AMX de la formulación *MLX:AMX:CD* ha disminuido hasta 89,12 %, mientras el contenido de MLX de la misma formulación sigue manteniéndose en los límites de aceptación (96,8 %) ya que la AMX es menos estable a las altas temperaturas. Con respecto a la formulación *MLX:AMX:Sacarina* en condiciones aceleradas, se produjo un descenso del pH a 7,65 dentro de los límites de aceptación (pH 7,4-8,8) indicando que la temperatura de 40°C afecta a la estabilidad física de la formulación. Por otro lado, los contenidos de MLX y AMX también disminuyeron a los 6 meses hasta valores de 95,74 % y 90,12 %, respectivamente dentro de los límites de aceptación (90-110 %). Por lo tanto se han producido variaciones tanto en propiedades físicas como químicas de la formulación a partir de los 6 meses de almacenamiento a 40°C. Al comparar ambas formulaciones, la formulación *MLX:AMX:CD* ha demostrado ser ligeramente más inestable ya que en condiciones aceleradas hay una mayor

degradación de AMX presentando una concentración de 89,12 % a los 6 meses.

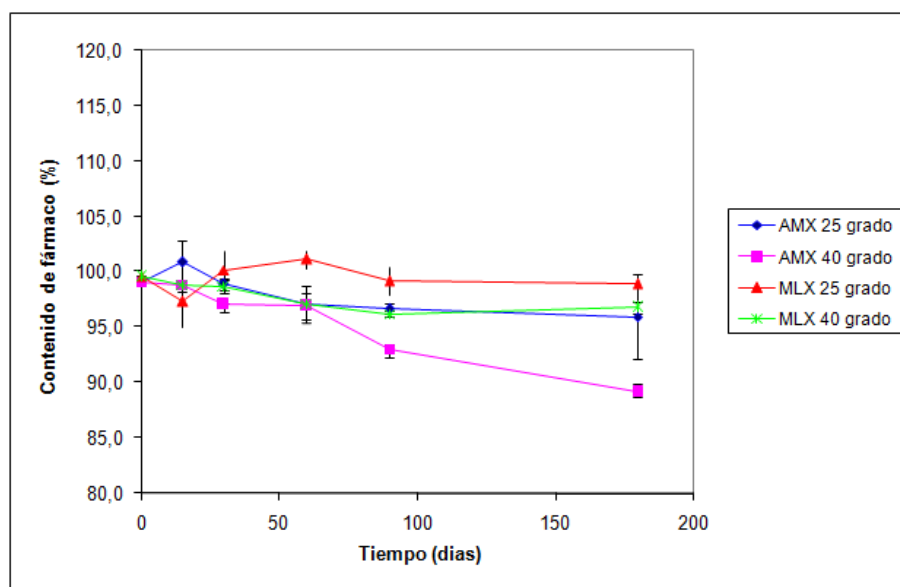
Además, se estudió la estabilidad en condiciones de utilización. Las formulaciones son liofilizadas que se administran inmediatamente después de su reconstitución. Por lo tanto se valoraron las propiedades físico-químicas de las disoluciones reconstituidas al inicio y al cabo de 24 horas. No se han observado cambios tanto físicos como químicos durante el estudio, confirmando la estabilidad de las formulaciones seleccionadas durante ese tiempo.

La formulación *MLX:AMX:Sacarina* ha demostrado tener mejor biodisponibilidad y estabilidad química respecto a la formulación *MLX:AMX:CD*, y además el coste del excipiente utilizado resulta ser más asequible, lo cual lo hace más atractivo de cara a ser empleado en la industria farmacéutica veterinaria. Por todo ello, esta formulación fue seleccionada para llevar a cabo un estudio de caracterización mediante la técnica instrumental calorimetría diferencial de barrido (DSC). En este estudio, se ha observado que los picos característicos de las sustancias activas MLX y AMX desaparecen en los termogramas de la formulación, indicando la aparición de una estructura amorfa que influye positivamente en el incremento de solubilidad del MLX.



**Figura 11.1.** El porcentaje de contenido de fármacos de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* y sus desviaciones estándar al frente del tiempo





**Figura 11.2.** El porcentaje de contenido de fármacos de la formulación *MLX:AMX:CD* y sus desviaciones estándar al frente del tiempo

## Conclusiones

1. Se estudia la influencia de distintos excipientes: surfactantes, hidratos de carbono, sacarina sódica y un polímero aniónico, en la solubilidad de MLX en medios acuosos y tampones de pHs 7,4, 8,8 y 9,8. Se observó una mejora de la concentración de saturación utilizando surfactantes mediante la formación de micelas y con el empleo de sacarina sódica y azúcares por la posible formación de puentes de hidrógeno. Se demostró que la concentración de saturación de MLX dependía del pH y de la polaridad del medio, aumentando exponencialmente en el rango de pH de 7,4 a 9,8 y a partir de valores de pH mayores, la polaridad del medio era determinante en la solubilización del MLX.
2. Mediante la utilización de cantidades crecientes de hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina se forman complejos de inclusión con MLX con una mayor solubilidad en el rango de pHs de 7,4 a 9,8.
3. Se modificó el tampón de pH 8,8 aumentando la concentración de glicina y se observó un incremento proporcional en el coeficiente de solubilidad de MLX.
4. Partiendo de los resultados de preformulación, se elaboraron dos formulaciones liofilizadas: *MLX:AMX:Sacarina* y *MLX:AMX:CD*, ambas con una dosis de AMX de 1000 mg/ml y de 5 mg/ml de MLX, empleándose un medio de pH 8,8 con los excipientes más adecuados (sacarina sódica al 0,9% e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina al 7,5%).
5. Los estudios de IR sobre las formulaciones de MLX evidenciaron la existencia de interacciones entre los distintos excipientes y el fármaco, formando complejos de inclusión con HP- $\beta$ -CD (en el caso de la formulación MLX:CD) y de puentes de hidrógeno con sacarina sódica (en el caso de la formulación MLX:Sacarina). Estas interacciones ayudaron a solubilizar el MLX que es poco soluble en medio acuoso.

6. Los halos amorfos obtenidos en difracción de rayos X para ambas formulaciones seleccionadas indican la presencia de una estructura amorfa, lo cual facilita su solubilización. Estos resultados coinciden con los obtenidos en microscopía electrónica de barrido en la que se aprecia la desaparición de estructuras cristalinas de los materiales de partida en ambas formulaciones.
7. Las formulaciones desarrolladas demostraron ser inocuas in vitro mediante el estudio de hemólisis y la prueba de precipitación.
8. El estudio farmacocinético comparativo entre las formulaciones seleccionadas y la disolución control ha demostrado que la formulación *MLX:AXM:Sacarina* obtuvo los mejores valores farmacocinéticos tanto de AUC, como de C<sub>max</sub> siendo la que posee una biodisponibilidad más adecuada.
9. El estudio de estabilidad a temperatura ambiente ha demostrado que las formulaciones seleccionadas son estables física y químicamente durante un año. Asimismo, el estudio de estabilidad en condiciones de utilización ha demostrado, también, que las formulaciones seleccionadas son estables física y químicamente hasta 24 horas después de su reconstitución.
10. Se llevó a cabo un estudio de caracterización por calorimetría diferencial de barrido de la formulación *MLX:AMX:Sacarina* debido a su adecuada estabilidad, ligeramente superior a la formulación *MLX:AMX:CD*, y por el coste del excipiente utilizado. La formulación seleccionada ha demostrado presentar una estructura típicamente amorfa ya que desaparecen los picos endotérmicos característicos de cada componente de partida.

## Bibliografía

- AGENCY, E. M. European Medicines Agency. , nº August: 1–20, 2003.
- AHMED, I. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, nº 6: 871–882, 2002.
- ALVAREZ-NÚÑEZ, F. A. y YALKOWSKY, S. H. Buffer capacity and precipitation control of pH solubilized phenytoin formulations. *International journal of pharmaceuticals*, **185**, nº 1: 45–9, 1999.
- AMBIKE, A. A., MAHADIK, K. R. y PARADKAR, A. Stability study of amorphous valdecoxib. *International journal of pharmaceuticals*, **282**, nº 1-2: 151–62, 2004.
- ARCAND, Y., HAWARI, J. y GUIOT, S. R. Solubility of pentachlorophenol in aqueous solutions: The pH effect. *Water Research*, **29**, nº 1: 131–136, 1995.
- AULTON, M. *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Elsevier, Madrid, Spain, 2004.
- BABU, P. R., SUBRAHMANYAM, C. V., THIMMASSETTY, J., MANAVAN, R. y VALLIAPPAN, K. Solubility of Meloxicam in Mixed Solvent Systems. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, **25**, nº 1: 23–28, 2007.
- BALASUBRAMANIAN, D., SRINIVAS, V., GAIKAR, V. G. y SHARMA, M. M. Aggregation behavior of hydrotropic compounds in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, **93**, nº 9: 3865–3870, 1989.
- BANERJEE, R., BHATT, P. M., RAVINDRA, N. V. y DESIRAJU, G. R. Saccharin salts of active pharmaceutical ingredients, their crystal structures, and increased water solubilities. 2005.

- BISSON-BOUTELLIEZ, C., FONTANAY, S., FINANCE, C. y KEDZIEREWICZ, F. Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin beta-cyclodextrin complexes. *AAPS PharmSciTech*, **11**, nº 2: 574–81, 2010.
- BIWER, A., ANTRANIKIAN, G. y HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied microbiology and biotechnology*, **59**, nº 6: 609–17, 2002.
- BRAZEAU, G. A. y FUNG, H. L. An in vitro model to evaluate muscle damage following intramuscular injections. *Pharmaceutical research*, **6**, nº 2: 167–70, 1989.
- BROWN, S., TEMPLETON, L., PRATER, D. A. y POTTER, C. J. Use of an in vitro haemolysis test to predict tissue irritancy in an intramuscular formulation. *Journal of parenteral science and technology : a publication of the Parenteral Drug Association*, **43**, nº 3: 117–20, 1989.
- BUGGINS, T. R., DICKINSON, P. A. y TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. *Advanced drug delivery reviews*, **59**, nº 15: 1482–503, 2007.
- BUSCH, U., SCHMID, J., HEINZEL, G., SCHMAUS, H., BAIERL, J., HUBER, C. y ROTH, W. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **26**, nº 6: 576–84, 1998.
- CARTER, D. H., LUTTINGER, M. y GARDNER, D. L. Controlled release parenteral systems for veterinary applications. *Journal of Controlled Release*, **8**, nº 1: 15–22, 1988.
- C.BOYLAN, J. y L.NAIL, S. Parenteral Products. En G. L. Banker y C. T. Rhodes, eds., *Modern Pharmaceutics*, 445. Marcel Dekker Inc., NewYork, 1979.
- CHEN, M.-L., STRAUGHN, A. B., SADRIEH, N., MEYER, M., FAUSTINO, P. J., CIAVARELLA, A. B., MEIBOHM, B., YATES, C. R. y HUSSAIN, A. S. A modern view of excipient effects on bioequivalence: case study of sorbitol. *Pharmaceutical research*, **24**, nº 1: 73–80, 2007.
- CONSULTANTS, W. M. G. *Animal Health Industry Review*. Wood MacKenzie, Edinburgh, UK, 2011.

- CONVENTION, U. S. P. *United States Pharmacopoeia*. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, 33 ed<sup>ón</sup>., 2010.
- CROUBELS S., DE BAERE S. y DE BACKER P. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage. *Analytica Chimica Acta*, **483**, n<sup>o</sup> 1: 419–427, 2003.
- DAO THANH, T., FLORES-JAIME, J., ÁLVAREZ ALVAREZ, C. y DE LA TORRE-IGLESIAS, P. Spectrophotometric simultaneous determination of meloxicam and sodium amoxicillin in combined dosage forms. *Journal of Pharmacy Research*, **3**, n<sup>o</sup> 3: 245–248, 2010.
- EL-MARADNY, H. A., MORTADA, S. A., KAMEL, O. A. y HIKAL, A. H. Characterization of ternary complexes of meloxicam-HP $\beta$ CD and PVP or L-arginine prepared by the spray-drying technique. *Acta pharmaceutica*, **58**, n<sup>o</sup> 4: 455–466, 2008.
- ELGINDY, N., ELKHODAIRY, K., MOLOKHIA, A. y ELZOGHBY, A. Lyophilization monophase solution technique for improvement of the physicochemical properties of an anticancer drug, flutamide. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, **74**, n<sup>o</sup> 2: 397–405, 2010.
- ERAH, P. O., GODDARD, A. F., BARRETT, D. A., SHAW, P. N. y SPILLER, R. C. Original articles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **39**: 5–12, 1997.
- ETMAN, M. A. y NAGGAR, V. F. Thermodynamics of paracetamol solubility in sugar-water cosolvent systems. *International Journal of Pharmaceutics*, **58**, n<sup>o</sup> 3: 177–184, 1990.
- FLORENCE, A. T. y ATTWOOD, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Pharmaceutical Press, London, 4th ed<sup>ón</sup>., 2006.
- FRANK, D. W., GRAY, J. E. y WEAVER, R. N. Cyclodextrin nephrosis in the rat. *The American journal of pathology*, **83**, n<sup>o</sup> 2: 367–82, 1976.
- GHAREEB, M. M., ABDULRASOOL, A. A., HUSSEIN, A. A. y NOORDIN, M. I. Kneading technique for preparation of binary solid dispersion of meloxicam with poloxamer 188. *AAPS PharmSciTech*, **10**, n<sup>o</sup> 4: 1206–15, 2009.

- GLADYS, G., CLAUDIA, G. y MARCELA, L. The effect of pH and triethanolamine on sulfoxazole complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, **20**, nº 3: 285–93, 2003.
- GOULD, S. y SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **43**, nº 10: 1451–9, 2005.
- GUIDELINE, I. H. T. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. ICH Topic Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- GUIDELINE, I. H. T. *Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products*. ICH Q1A (R2) (CPMP/ICH/2736/99), 1999.
- HIGUCHI, T. y CONNORS, K. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, **4**: 117–212, 1965.
- IRIE, T. y UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences*, **86**, nº 2: 147–62, 1997.
- JOHNSON, J. L. H., HE, Y. y YALKOWSKY, S. H. Prediction of precipitation-induced phlebitis: a statistical validation of an in vitro model. *Journal of pharmaceutical sciences*, **92**, nº 8: 1574–81, 2003.
- JOHNSON, R. E., KIRCHHOFF, C. F. y GAUD, H. T. Mannitol-sucrose mixtures—versatile formulations for protein lyophilization. *Journal of pharmaceutical sciences*, **91**, nº 4: 914–22, 2002.
- KARPIŃSKA, J. Derivative spectrophotometry-recent applications and directions of developments. *Talanta*, **64**, nº 4: 801–22, 2004.
- KI, H.-M. y CHOI, H.-K. The effect of meloxicam/ethanolamine salt formation on percutaneous absorption of meloxicam. *Archives of pharmacal research*, **30**, nº 2: 215–21, 2007.

- KRZYZANIAK, J. F., ALVAREZ NÚÑEZ, F. A., RAYMOND, D. M. y YALKOWSKY, S. H. Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. *Journal of pharmaceutical sciences*, **86**, nº 11: 1215–7, 1997a.
- KRZYZANIAK, J. F., RAYMOND, D. M. y YALKOWSKY, S. H. Lysis of human red blood cells 2: effect of contact time on cosolvent induced hemolysis. *International Journal of Pharmaceutics*, **152**, nº 2: 193–200, 1997b.
- KRZYZANIAK J.F., RAYMOND D.M. y YALKOWSKY S.H. Lysis of human red blood cells 2: effect of contact time on cosolvent induced hemolysis. *International Journal of Pharmaceutics*, **152**, nº 2: 8, ????
- LEE, J., LEE, S. C., ACHARYA, G., CHANG, C.-J. y PARK, K. Hydrotropic solubilization of paclitaxel: analysis of chemical structures for hydrotropic property. *Pharmaceutical research*, **20**, nº 7: 1022–30, 2003.
- LI, P., TABIBI, S. E. y YALKOWSKY, S. H. Combined effect of complexation and pH on solubilization. *Journal of pharmaceutical sciences*, **87**, nº 12: 1535–7, 1998.
- LIU, Z., LU, W., QIAN, L., ZHANG, X., ZENG, P. y PAN, J. In vitro and in vivo studies on mucoadhesive microspheres of amoxicillin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **102**, nº 1: 135–44, 2005.
- LOFTSSON, T. y BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of pharmaceutical sciences*, **85**, nº 10: 1017–25, 1996.
- LU, X. y PIKAL, M. J. Freeze-drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharmaceutical development and technology*, **9**, nº 1: 85–95, 2004.
- MARCINIEC, B., PŁOTKOWIAK, Z., WACHOWSKI, L., KOZAK, M. y POPIELARZ-BRZEZIŃSKA, M. Analytical Study of  $\beta$ -Irradiated Antibiotics in the Solid State. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **68**, nº 2: 14, 2002.
- MATSCHKE, C., ISELE, U., VAN HOOGEVEST, P. y FAHR, A. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **85**, nº 1-3: 1–15, 2002.



- MEDLICOTT, N. J., WALDRON, N. A. y FOSTER, T. P. Sustained release veterinary parenteral products. *Advanced drug delivery reviews*, **56**, nº 10: 1345–65, 2004.
- MORA, M. J., LONGHI, M. R. y GRANERO, G. E. Synthesis and characterization of binary and ternary complexes of diclofenac with a methyl-beta-CD and monoethanolamine and in vitro transdermal evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, **45**, nº 9: 4079–88, 2010.
- MYRDAL, P. B. y YALKOWSKY, S. H. Solubilization of drugs. En J. Swarbrick y J. Boylan, eds., *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, 161–217. Dekker, New York, 1998.
- NAGARALLI, B. S., SEETHARAMAPPA, J. y MELWANKI, M. B. Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxycillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **29**, nº 5: 859–64, 2002.
- NAIDU, N. B., CHOWDARY, K. P. R., MURTHY, K. V. R., SATYANARAYANA, V., HAYMAN, A. R. y BECKET, G. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **35**, nº 1: 75–86, 2004.
- NALLURI, B. N., CHOWDARY, K. P. R., MURTHY, K. V. R., BECKET, G. y CROOKS, P. A. Tablet formulation studies on nimesulide and meloxicam-cyclodextrin binary systems. *AAPS PharmSciTech*, **8**, nº 2: Article 36, 2007.
- NASSAB, P. R., RAJKÓ, R. y SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Physicochemical characterization of meloxicam-mannitol binary systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **41**, nº 4: 1191–7, 2006.
- NICHOLS, G. Applications of cathodoluminescence spectroscopy and imaging in the characterisation of pharmaceutical materials. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, **45**, nº 1-2: 19–42, 2012.
- NOUWS, J. F., SMULDERS, A. y RAPPALINI, M. A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramus-

- cularly to calves, pigs and sheep. *The Veterinary quarterly*, **12**, nº 3: 129–38, 1990.
- O'NEILL, M. A. A. y GAISFORD, S. Application and use of isothermal calorimetry in pharmaceutical development. *International journal of pharmaceutics*, **417**, nº 1-2: 83–93, 2011.
- OSHIDA, S., DEGAWA, K., TAKAHASHI, Y. y AKAISHI, S. Physico-chemical properties and local toxic effects of injectables. *The Tohoku journal of experimental medicine*, **127**, nº 4: 301–16, 1979.
- PAPE, W. J., PFANNENBECKER, U. y HOPPE, U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular toxicology*, **1**, nº 4: 525–36, 1988.
- PATEL, J. K. y CHAVDA, J. R. Formulation and evaluation of stomach-specific amoxicillin-loaded carbopol-934P mucoadhesive microspheres for anti-Helicobacter pylori therapy. *Journal of microencapsulation*, **26**, nº 4: 365–76, 2009.
- PÉREZ-LOZANO, P., GARCÍA-MONTOYA, E., ORRIOLS, A., MIÑARRO, M., TICÓ, J. R. y SUÑÉ-NEGRE, J. M. Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **42**, nº 2: 192–9, 2006.
- POMÁZI, A., AMBRUS, R., SIPOS, P. y SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Analysis of co-spray-dried meloxicam-mannitol systems containing crystalline microcomposites. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **56**, nº 2: 183–90, 2011.
- PRANAB, K. y BHATTACHERYYA, C. W. Amoxycillin. En K. Florey, ed., *Analytical Profiles of Drug substances. Volume 7*, 19–41. Academic Press, Inc., London, 1973.
- PYÖRÄLÄ, P., KAARTINEN, L. y SÖDERGÅRD, H. Pharmacokinetics and tissue irritation of sodium dicloxacillin in lactating cows after intravenous and intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **17**, nº 2: 157–159, 1994.
- RASMUSSEN, F. Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs. *Veterinary Science Communications*, **2**, nº 1: 173–182, 1978.

- REDDY, L. H., VIVEK, K., BAKSHI, N. y MURTHY, R. S. R. Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLN): preparation, characterization, in vitro drug release, and pharmacokinetic evaluation. *Pharmaceutical development and technology*, **11**, nº 2: 167–77, 2006.
- REED, K. W. y YALKOWSKY, S. H. Lysis of Human Red Blood Cells in the Presence of Various Cosolvents. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **39**, nº 2: 64–69, 1985.
- REER, O., BOCK, T. K. y MÜLLER, B. W. In vitro corneal permeability of diclofenac sodium in formulations containing cyclodextrins compared to the commercial product voltaren ophtha. *Journal of pharmaceutical sciences*, **83**, nº 9: 1345–9, 1994.
- RODENAS, V., GARCIA, M., SÁNCHEZ-PEDREÑO, C. y ALBERO, M. Simultaneous determination of propacetamol and paracetamol by derivative spectrophotometry. *Talanta*, **52**, nº 3: 517–523, 2000.
- RODRIGUEZ GALAN, I. Ciclodextrinas. En Faulí i Trillo, C. y M. Aroztegui Trenchs, eds., *Tratado de farmacia galénica*, 211–218. Luzán 5, 1993.
- ROMAÑUK, C. B., MANZO, R. H., LINCK, Y. G., CHATTAH, A. K., MONTI, G. A. y OLIVERA, M. E. Characterization of the solubility and solid-state properties of saccharin salts of fluoroquinolones. *Journal of pharmaceutical sciences*, **98**, nº 10: 3788–801, 2009.
- ROWE, R. C., SHESKEY, P. J. y QUINN, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, London, 2006.
- SAHASATHIAN, T., KERDCHOLPETCH, T., CHANWEROCH, A., PRAPHAIRAKSIT, N., SUWONJANDEE, N. y MUANGSIN, N. Sustained release of amoxicillin from chitosan tablets. *Archives of pharmacal research*, **30**, nº 4: 526–31, 2007.
- SÁNCHEZ NAVARRO, A. New Formulations of Amoxicillin/Clavulanic Acid: A Pharmacok... : Clinical Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, **44**, nº 11: 1097–1115, 2005.
- SEEDHER, N. y BHATIA, S. Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems. *AAPS PharmSciTech*, **4**, nº 3: E33, 2003.

- SENTURK, M., KUFREVIOGLU, O. I. y CIFTCI, M. Effects of some antibiotics on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **23**, nº 1: 144–8, 2008.
- SILVA, F. E. B. y KRATZ, C. D. P. Development and Evaluation of Amoxicillin Formulations by Direct Compression : Influence of the Adjuvants on Physicomechanical and Biopharmaceutical Properties of the Tablets. *Acta Farm. Bonaerense*, **24**, nº 1: 39–47, 2005.
- SOMESHWAR, K., CHITHALURU, K., RAMARAO, T. y KUMAR, K. K. K. Formulation and evaluation of effervescent floating tablets of tizanidine hydrochloride. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, **61**, nº 2: 217–26, 2011.
- SONGSURANG, K., PAKDEEBUMRUNG, J., PRAPHAIRAKSIT, N. y MUANGSIN, N. Sustained release of amoxicillin from ethyl cellulose-coated amoxicillin/chitosan-cyclodextrin-based tablets. *AAPS PharmSciTech*, **12**, nº 1: 35–45, 2011.
- SOURI, E., AMANLOU, M., FARSAM, H. y AFSHARI, A. A rapid derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of naphazoline and antazoline in eye drops. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **54**, nº 1: 119–22, 2006.
- SPYKER, D. A., RUGLOSKI, R. J., VANN, R. L. y O'BRIEN, W. M. Pharmacokinetics of amoxicillin: dose dependence after intravenous, oral, and intramuscular administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **11**, nº 1: 132–41, 1977.
- STEI, P., KRUSS, B., WIEGLEB, J. y TRACH, V. Local Tissue Tolerability of Meloxicam, a New NSAID: Indications for Parenteral, Dermal and Mucosal Administration. *Rheumatology*, **35**, nº suppl 1: 44–50, 1996.
- STELLA, V. J. y HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology*, **36**, nº 1: 30–42, 2008.
- STICHTENOTH, D. O., WAGNER, B. y FRÖLICH, J. C. Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, **45**, nº 2: 44–9, 1997.
- STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical research*, **21**, nº 2: 201–30, 2004.

- SUBRAHMANYAM, C. *Essentials of Physical Pharmacy*. Vallabh Prakashan, New Delhi, 1st ed<sup>ón</sup>, 2003.
- SURBER, C. y DUBACH, U. C. Tests for local toxicity of intramuscular drug preparations. Comparison of in vivo and in vitro findings. *Arzneimittel-Forschung*, **39**, nº 12: 1586–9, 1989.
- SWEETANA, S. y AKERS, M. J. Solubility Principles and Practices for Parenteral Drug Dosage Form Development. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **50**, nº 5: 330–342, 1996.
- SZEJTLI, J. *Molecular Encapsulation by Cyclodextrins*. Inf. téc., Budapest, 1997.
- TINWALLA, A. Y., HOESTEREY, B. L., XIANG, T. X., LIM, K. y ANDERSON, B. D. Solubilization of thiazolobenzimidazole using a combination of pH adjustment and complexation with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Pharmaceutical research*, **10**, nº 8: 1136–43, 1993.
- TOMMASINI, S., CALABRÒ, M. L., RANERI, D., FICARRA, P. y FICARRA, R. Combined effect of pH and polysorbates with cyclodextrins on solubilization of naringenin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **36**, nº 2: 327–33, 2004.
- TURP, H. A., TÜRKYILMAZ, A. y AKDOGAN, C. *Pharmaceutical formulations of meloxicam*. 2010.
- VIJAYA KUMAR, S. G. y MISHRA, D. N. Preparation, characterization and in vitro dissolution studies of solid dispersion of meloxicam with PEG 6000. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, **126**, nº 8: 657–64, 2006.
- WANG, Z., DENG, Y., SUN, S. y ZHANG, X. Preparation of hydrophobic drugs cyclodextrin complex by lyophilization monophasic solution. *Drug development and industrial pharmacy*, **32**, nº 1: 73–83, 2006.
- WURSTER, D. E., BHATTACHARJYA, S. y FLANAGAN, D. R. Effect of curing on water diffusivities in acrylate free films as measured via a sorption technique. *AAPS PharmSciTech*, **8**, nº 3: E71, 2007.
- YALKOWSKY, S. H. *Techniques of solubilization of drugs*. M. Dekker, New York, 1981.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- YALKOWSKY, S. H., KRZYZANIAK, J. F. y WARD, G. H. Formulation-related problems associated with intravenous drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, **87**, nº 7: 787–96, 1998.
- YALKOWSKY, S. H., VALVANI, S. C. y JOHNSON, B. W. In vitro method for detecting precipitation of parenteral formulations after injection. *Journal of pharmaceutical sciences*, **72**, nº 9: 1014–7, 1983.